

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 738**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C07K 1/04 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2012 PCT/EP2012/051816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104399**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012 E 12703757 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 2670525**

54 Título: **Dispositivo y método para la generación de micromatrices moleculares**

30 Prioridad:

03.02.2011 DE 102011010307

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.03.2022

73 Titular/es:

**BIOCOPY GMBH (100.0%)
Elzstrasse 27
79312 Emmendingen, DE**

72 Inventor/es:

**ROTH, GÜNTER y
BURGER, JÜGEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 897 738 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

Dispositivo y método para la generación de micromatrices moleculares

La invención se refiere a un dispositivo y a un método para la generación de micromatrices moleculares. La invención se refiere, por lo tanto, a un enfoque universal para la generación de micromatrices de proteínas, micromatrices de ADN y micromatrices de ARN (en general, micromatrices de ácido nucleico), mediante producción de una molécula de salida de una micromatriz molecular plantilla mediante procesos enzimáticos o químicos y transferencia de la molécula de salida a la micromatriz molecular deseada.

ANTECEDENTES

Última tecnología en el copiado de matriz de ADN a proteínas

La producción de la micromatriz de proteínas en la "configuración clásica" es sintetizar proteínas en células, seguido de la purificación de las proteínas de células lisadas y transferencia de solución proteica a una micromatriz. Esto se lleva a cabo, normalmente, para cada proteína de forma individual. Si todas las soluciones proteicas se purifican, un sistema de dispensación se usa para generar la micromatriz de proteínas. Aunque la presente técnica se ha utilizado durante más de una década, es complicada y necesita mucho esfuerzo en términos de tiempo y dinero, especialmente el mantenimiento del cultivo celular y la expresión proteica en las células. Ello lleva, con frecuencia, a costes de más de €1000 para cada micromatriz de proteínas.

Una síntesis química in situ de proteínas en un chip no ha sido exitosa debido al pobre rendimiento de la síntesis combinado con la insuficiente pureza del producto, en comparación con las proteínas naturales nacidas de la célula. Solo fragmentos proteicos cortos, llamados péptidos, son aplicables con la síntesis in situ. Pero para el valor y la significancia de información, la mejor prueba bioquímica necesita llevarse a cabo con proteínas de longitud completa expresadas, preferiblemente, de manera natural.

Se han desarrollado enfoques hacia la síntesis de proteínas de longitud completa basadas en micromatrices para producir proteínas directamente a partir de ADN. Una reseña [2] publicada en febrero de 2010 muestra diferentes enfoques y variantes. Esta enfatiza cuáles de dichos métodos ya se han llevado a cabo con el fin de generar una matriz de proteínas a partir de una matriz de ADN como fuente plantilla. Un mensaje básico es que la proteína solo puede sintetizarse si el ADN ha codificado varias unidades de "información" funcionales, como el centro de unión al ribosoma, promotores, etc. Puede decirse que el ADN tiene que estar "listo para la expresión" para reconocerse y procesarse por una mezcla de expresión libre de células, la cual transcribe luego el ADN y traduce el ARNm a la proteína correspondiente.

En 2001, He y Taussig publicaron el sistema PISA [3] (documento WO 02/14860). Aquí, el ADN se ha mezclado con la mezcla de expresión libre de células directamente antes de la dispensación. Pequeñas gotas se han transferido posteriormente a una superficie. Cada una de las gotas genera la proteína según el ADN añadido. Dentro de la secuencia de proteínas, se codifica una etiqueta His. Dicha etiqueta His se une específicamente a la así llamada superficie de níquel-NTA. Después de haber generado suficiente proteína, toda la superficie se enjuaga y, por lo tanto, se lava con líquido. Ello retira todo el ADN y todas las proteínas, las cuales no contienen la etiqueta His. Solo las proteínas que contienen una etiqueta His se adherirán a la superficie y, por lo tanto, se "purificarán" y separarán de todas las otras proteínas. La presente micromatriz puede usarse directamente para mediciones de unión de la interacción proteína-proteína. En 2006, se ha publicado una micromatriz de proteínas mediante el presente método, la cual contiene 13.000 proteínas o fragmentos de proteínas diferentes [4].

El sistema PISA sortea los esfuerzos de la purificación individual complicada de proteínas (en comparación con los métodos clásicos de síntesis de proteínas recombinantes), pero el esfuerzo de mezclar cada secuencia de ADN plantilla con el sistema de expresión libre de células directamente antes de la transferencia a la superficie de la micromatriz es aún enorme. Y debe llevarse a cabo para cada punto en la micromatriz en exactamente las mismas condiciones, en especial con respecto a la concentración y parámetros temporales. Ello solo puede llevarse a cabo y, en algunos casos, solo con gran dificultad, con un robot de pipeteo.

En 2004, LaBear publicó el sistema NAPPa (matriz de proteínas programables de ácido nucleico, NAPPa, por sus siglas en inglés) (documento US 6,800,453 B2) para la fabricación de matrices de proteínas a partir de matrices de ADN [5]. Aquí, se necesita una superficie que soporte dos moléculas aglutinantes. Se ha utilizado estreptavidina y un anticuerpo contra una etiqueta His. Sobre dicha superficie de aglutinante doble se ha impreso una micromatriz de ADN con ADN que contiene una etiqueta, que se une a la superficie. Un ADN biotinilado se ha utilizado para la prueba del concepto. Dichas micromatrices de ADN pueden almacenarse durante un máximo de 2 años. La vida útil de toda la micromatriz NAPPa se encuentra limitada por la vida útil del anticuerpo y del ADN. Directamente antes del uso, la micromatriz completa se cubre con el sistema de expresión libre de células. En cada punto, definido por el ADN del propio punto, se sintetiza una proteína diferente, la cual se difunde libremente. Pero cada proteína contiene una secuencia especial, la cual se une al anticuerpo. Por lo tanto, por pura probabilidad estadística, el anticuerpo se une a la superficie. Debido a la generación de la proteína directamente en el punto de ADN, la mayor parte de la proteína se unirá al punto o en su proximidad inmediata. Después de una etapa de lavado, solo el ADN y la proteína deseada

permanecen sobre la superficie y la micromatriz con las proteínas recientemente sintetizadas puede usarse para experimentos. En 2008, se publicó una micromatriz de proteínas con aproximadamente 1000 proteínas [6].

La ventaja de NAPPa en comparación con PISA es el desacoplamiento de la preparación de micromatriz de ADN de la síntesis de proteínas. Mientras en PISA las proteínas se sintetizan de forma directa e inherente durante y después de la fabricación de las micromatrices, el sistema NAPPa permite llevar a cabo un mayor número de micromatrices de ADN y almacenarlas durante largo tiempo. En el uso experimental, es importante que la proteína se haya sintetizado de manera reciente. Por lo tanto, el sistema NAPPa puede describirse como una micromatriz de proteínas "a demanda". Las desventajas son el sistema de doble aglutinante (que lleva a un factor de coste aumentado) en la superficie, como la estreptavidina y los anticuerpos, además de su permanencia junto con el ADN en la superficie (mayor probabilidad de unión inespecífica).

En 2008, He y otros (del grupo de Michael Taussig) publicaron el Sistema DAPA [1] (documento WO 2006/131687), un método que permite tomar una micromatriz de ADN original y generar varias copias como micromatrices de proteínas. En el presente sistema, el ADN de codificación de proteínas se dispensa como micromatriz de ADN sobre una superficie funcionalizada con epoxi comercial disponible. Ello se lleva a cabo como en la generación clásica de la micromatriz de ADN.

Para el sistema DAPA, se lleva una matriz de ADN al contacto con una segunda superficie mediante la disposición de una membrana entre ellas. La membrana se ha puesto en remojo previamente con un sistema de expresión libre de células, el cual comienza inmediatamente al contacto con la plantilla de ADN para producir proteínas según el ADN de cada punto de la micromatriz (como la configuración PISA). La proteína se difunde a través de la membrana y se une a la segunda superficie. De esta manera, se genera una micromatriz de proteínas. Se usa una superficie recogedora, como una superficie de níquel-NTA, y dentro del ADN se codifica según una etiqueta His conforme como secuencia de unión específica contra dicha superficie recogedora. Después de aproximadamente 3 horas, el sándwich se abre y la micromatriz de ADN, así como la micromatriz de proteínas, se ha lavado. Entonces, la micromatriz de proteínas puede usarse para experimentos y la micromatriz de ADN puede almacenarse hasta llevar a cabo la siguiente copia de proteínas o puede reutilizarse inmediatamente otra vez para llevar a cabo la siguiente micromatriz de proteínas.

La difusión hará que los puntos de proteínas sean más grandes que los puntos de ADN y también llevará a un borde borroso, que es una característica de la difusión que es inherente al proceso. El difuminado de difusión del borde es menor en relación con la delgadez de la membrana y la distancia de difusión resultante de la matriz de ADN a la superficie recogedora de proteínas.

En comparación con PISA y NAPPa, la ventaja más obvia del sistema DAPA es que pueden generarse varias copias de micromatriz de proteínas a partir de solo una micromatriz de ADN original. Ventajas adicionales son que no hay ADN perturbador, como en el sistema NAPPa, en la micromatriz de proteínas y solo se necesita una captura en la superficie de micromatriz de proteínas. Pero el presente sistema permite, al principio, llevar a cabo varias replicaciones de micromatriz de proteínas a partir de una micromatriz de ADN. Ello es un completo nuevo con respecto a todos los otros sistemas.

Sin embargo, el flujo de trabajo del sistema DAPA descrito para generar las micromatrices de proteínas tiene varias propiedades desfavorables, las cuales son principalmente inherentes a o relacionadas con la propia membrana.

En primer lugar, existe un contacto "duro" real físico entre la membrana y ambas superficies de matrices, lo cual resulta en rasguños y/o abrasión física con el tiempo y uso. Ello dañará la superficie de matriz de proteínas y limita su posterior uso. Las matrices de ADN se dañan, lo cual limita su vida útil con respecto al número total de micromatrices de proteínas hechas antes de que el ADN se desnaturalice o sufra una ablación por el proceso de copiado.

En segundo lugar, la membrana es, normalmente, un material no homogéneo que llevará proteína de manera imprevista a la copia de matriz de proteínas. La propia membrana es indefinida, dado que es un material no tejido y, por lo tanto, aleatorio. Dentro de dicho material, la difusión de las moléculas generadas no es omnidireccional, también descrito como anisotrópico, lo cual significa que hay direcciones preferidas y no preferidas. Debido a las fibras utilizadas dentro del material, la difusión puede ocurrir a lo largo de una fibra o en una dirección particular favorecida por el alineamiento aleatorio o semialeatorio de las fibras. Ello lleva a una falta de homogeneidad del patrón de proteínas generado, que es una convolución matemática de la imagen de ADN original y de la falta de homogeneidad de la membrana. Dado que cada proceso de copia necesita una membrana nueva, cada copia es inherentemente diferente de la siguiente, debido a las diferencias en las estructuras finas de las membranas. El presente efecto se convierte en más fuerte, cuanto más pequeño es el tamaño de estructura en la matriz de ADN. Como tal, el factor de transferencia impredecible e irreproducible mediante la membrana limita la resolución mínima de dicho proceso de copiado y reproducibilidad del método.

En tercer lugar, la reacción bioquímica de la producción de proteínas comienza inmediatamente después de llevar la membrana a que esté en contacto con el ADN. Por lo tanto, el conjunto de la matriz de ADN, membrana y segunda superficie en pila se acopla de forma automática al inicio de la reacción. Ello evita el montaje de varios reactores e

iniciación paralela de la producción de la micromatriz. No existe un inicio de reacción definido, en especial cuando se llevan a cabo múltiples montajes de forma simultánea. Ello también reduce la reproducibilidad.

En cuarto lugar, la instalación de la membrana es desafiante debido a su delgadez y es, por lo tanto, difícil de manejar. Ello se ve intensificado por el hecho de que las matrices de proteínas son cada vez mejores en calidad cuanto más delgada es la membrana, pero cuanto más delgada es la membrana humedecida, más frágil y más difícil es el manejo de la membrana, que potencialmente se desarma bajo su propio peso y, de esta manera, traga o atrapa burbujas de aire. Ello también reduce la reproducibilidad.

Durante el montaje de la matriz de ADN, membrana y segunda superficie, no deben atraparse burbujas de aire por la membrana. Ello solo puede evitarse por personal con experiencia.

Además, según publicaciones recientes, el dispositivo DAPA es complejo y, por lo tanto, propenso a errores en comparación con una configuración menos compleja.

Una desventaja adicional es que la generación de una micromatriz de una proteína requiere más de 3 horas, principalmente debido a la eficiencia de reacción limitada debido a los componentes activos (mezcla enzimática libre de células) que se están uniendo principalmente en o están interactuando con la membrana y, por consiguiente, se crea, en cierto grado, una separación del ADN plantilla de las enzimas de transcripción y traducción. Además, la difusión del producto proteico a través de la membrana requiere tiempo adicional. Ello lleva a un tiempo de expresión prolongado para la generación de la copia de proteínas.

Todas dichas desventajas llevan a una reproducibilidad inherentemente pobre del sistema DAPA, en gran medida debido a que el proceso depende del sistema de reacción mediada por membrana y de la transferencia de molécula de salida. Mediante el montaje, el contacto de la membrana y, por consiguiente, del sistema de expresión libre de células se llevará a cabo y las proteínas se producirán inmediatamente. No es posible en la configuración DAPA descrita desacoplar el montaje e inicio de reacción. La presente desventaja particular inhabilita la reproducibilidad de todo el sistema.

Al tener en cuenta dichas desventajas, existen algunos enfoques microfluídicos para sintetizar proteínas a partir de ADN mediante el uso de la expresión libre de células. Sin embargo, dichas publicaciones [7-10] en el campo de los microfluídicos se centran solo en obtener más proteína con menos mezcla de expresión libre de células y no en fabricar micromatrices de proteínas.

Última tecnología en el copiado de ADN a ADN/matriz de ARN

Debido a la amplia disponibilidad comercial de micromatrices de ADN, muy pocos grupos de investigación se han dedicado a tomar micromatrices de ADN originales y realizar copias en términos de micromatrices de ADN o micromatrices de ARN. Sin embargo, ha habido cierto progreso en la copia de micromatrices de ADN a ADN.

En 2001, Kumar y otros [11,12] utilizaron una técnica de impresión por contacto para generar una "serie de dilución de micromatrices". Por lo tanto, una micromatriz de ADN se ha impreso sobre una superficie con una unión química reversible. Dicha micromatriz de ADN se ha llevado a un contacto conforme cercano con una superficie de acrilamida. Las propiedades químicas de dicha superficie de acrilamida han abierto, de manera reversible, la unión química del ADN de la micromatriz maestra y han resuelto cierto ADN de la plantilla (o maestra) en la nueva matriz. Entonces, el ADN se ha unido de manera covalente a la acrilamida. La presente etapa puede repetirse varias veces y ha agotado la matriz maestra hasta que se ha retirado todo el ADN. Las copias de micromatriz de ADN generadas pueden llevarse a cabo de dos maneras.

Si el mismo tiempo de resolución se aplicara siempre, se generaría una serie de dilución del ADN, lo cual llevaría a copias de micromatriz de ADN que contengan menos ADN para cada copia siguiente. Si se aplicara con un tiempo de resolución creciente experimentalmente determinado, todas las copias contendrían aproximadamente la misma cantidad de ADN. Como tal, con la presente técnica es posible generar copias de una micromatriz maestra de ADN, pero la micromatriz maestra de ADN se agota con el tiempo. La cantidad inicial de ADN solo se distribuye a todas las copias realizadas. De modo que es una replicación, pero sin amplificación.

Yu y otros presentaron en 2005 [13] una copia de afinidad de una micromatriz de ADN. Aquí, se ha impreso una micromatriz de ADN primaria. Dicha micromatriz de ADN primaria se ha incubado con una mezcla de ADN, la cual contenía ADNc modificado con tiol que se une al ADN en la micromatriz primaria. Como tal, el ADNc se hibrida exactamente en los diferentes puntos de la micromatriz primaria. Luego, una superficie cubierta de oro entra en contacto conforme cercano con la micromatriz primaria. Debido a dicha proximidad cercana, los grupos tiol interactúan y se unen, de manera covalente, a la superficie de oro. Mediante calentamiento y división de las dos superficies, se ha fabricado una copia negativa de la micromatriz de ADN inicial.

Ello permite solo la creación de una copia negativa. Debido al uso del sistema de unión de oro y tiol, no es posible realizar un negativo del negativo, y ello limita el proceso a la realización de negativos solamente. Además, el contacto conforme cercano entre ambas superficies duras es muy desfavorable dado que lleva a estrés mecánico muy fuerte y, como tal, a rasguños y abrasión mecánica, especialmente del recubrimiento de oro delgado de la superficie.

Nuevamente, el ADN no se ha amplificado directamente en la micromatriz; se ha presintetizado y luego se ha aplicado para la hibridación.

En 2006, S. Kim y otros [14] han evitado el contacto conforme entre las diferentes superficies mediante el uso de un espaciador en forma de "máscara de agujeros". Ellos han impreso una micromatriz y han hibridado el ADNc en los diferentes puntos de la micromatriz. Luego, una máscara con agujeros en exactamente las posiciones de los puntos se ha dispuesto sobre aquella y se ha llenado de líquido. A dicho sándwich, se ha aplicado una membrana de nylon. Mediante aplicación de calor y un campo eléctrico atractivo, el ADNc se ha liberado de la superficie primaria y se ha transferido a la membrana de nylon. Se ha generado una copia de micromatriz de ADN negativa. Después del bloqueo, la superficie pudo usarse para los experimentos.

La presente configuración permite, nuevamente, las copias de micromatriz negativas, pero el bloqueo correcto de la superficie de dicha copia negativa permitirá la repetición del presente proceso a partir del negativo, de modo que una copia negativa negativa y, como tal, una copia positiva, será posible. Nuevamente, el ADNc no se ha sintetizado in situ en la matriz; se ha incubado como una mezcla preparada en la superficie primaria. Una desventaja adicional es la máscara con agujeros. Tiene que ser exactamente en el formato y especialmente en la rejilla de los puntos de la micromatriz de ADN primaria y tiene que posicionarse de manera exacta. Dada la longitud de un portaobjetos de vidrio para microscopio de 75 mm y un tamaño de punto de 100 μm , la máscara tiene que colocarse bajo una inclinación de menos de 0,08° y, para un nuevo formato de micromatriz, tiene que realizarse una nueva máscara con agujeros.

En el mismo año, 2006, Y. Kim y otros [15] presentaron una tecnología avanzada de copiado para copias de micromatrices de ADN a ADN. Primero, se ha impreso una micromatriz de ADN primaria en un sustrato. Luego, se ha usado ADN polimerasa directamente sobre dicha superficie para generar el ADNc. El iniciador de la polimerasa ya contenía una modificación de biotina. Después de la amplificación por la polimerasa, cada punto contenía su ADNc etiquetado con biotina. Luego, una segunda superficie cubierta de estreptavidina se ha puesto en fuerte contacto con la superficie primaria. Debido a la cercana proximidad, la biotina se une a la estreptavidina. Mediante calentamiento, la fuerza de la unión entre ADN y ADNc se reduce y ambas superficies se separan la una de la otra. Ello hace que una copia negativa permanezca en la superficie secundaria.

La ventaja de la presente configuración es que el ADN se amplifica in situ directamente en la micromatriz, de modo que no se necesita síntesis alguna. También la transferencia es, debido a la unión específica entre biotina y estreptavidina, altamente específica. Las desventajas son el contacto conforme cercano entre las superficies, que lleva a daño mecánico de las matrices, así como que solo pueden obtenerse copias negativas. El proceso no pudo repetirse con el sistema de unión de estreptavidina-biotina, entonces otros pares de unión tienen que evaluarse, si debe mantenerse una copia positiva.

Además, el documento WO2006/058246A2 describe un dispositivo y un método para reproducir una micromatriz de ADN (matriz maestra) a un sustrato de replicación, en donde las superficies que se confrontan de la matriz maestra y el sustrato de replicación se separan por una capa de líquido.

Conclusión sobre la técnica anterior con respecto al copiado de matrices

Para la copia de ADN a ADN solamente, Y. Kim y otros [15] han concluido en usar un sistema de amplificación de ADN enzimático como beneficioso para el proceso de replicación. Este entregará inherentemente "tinta de ADN" para llevar a cabo la copia, independientemente de la secuencia de ADN, mientras que S. Kim y otros [14] han reconocido sortear el contacto conforme cercano entre superficies, para evitar la abrasión mecánica, así como para transferir el ADN dentro del líquido. Ninguno de ellos ha llevado a cabo una copia positiva del ADN inicial.

Para la copia de ADN a proteína, hay dos sistemas de generación claves (PISA y NAPP), los cuales permiten convertir una micromatriz de ADN en una micromatriz de proteínas. Sin embargo, ambos sistemas usan y consumen la micromatriz de ADN. Taussig y otros [1] han mejorado su propio sistema PISA a la disposición DAPA, lo cual permite llevar a cabo varias copias de micromatriz de proteínas sin utilizar toda la micromatriz de ADN plantilla original. Pero el sistema es inherentemente indefinido debido a sus condiciones iniciales, debido al hecho de que el montaje y el inicio de reacción se encuentran acoplados. Ello limita la reproducibilidad y debido al contacto duro entre diferentes superficies, nuevamente las matrices sufren en calidad y reproducibilidad por la abrasión mecánica.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Ha sido un objetivo de la invención proveer un dispositivo y un método para la generación de micromatrices moleculares que superen los problemas conocidos en la técnica anterior. Un objeto adicional de la invención ha sido proveer un enfoque unificado para permitir, en la misma configuración (dispositivo, método y sistema), que ADN, ARN y micromatrices de proteínas se produzcan mediante un flujo de trabajo idéntico. Según la técnica anterior, el problema técnico subyacente de la presente invención puede verse como la provisión de un dispositivo y método mejorados o alternativos para permitir la transmisión rápida, controlable y reproducible de moléculas como, por ejemplo, proteínas, ADN o ARN, de una plantilla a una superficie de captura. Un problema técnico adicional ha sido proveer el completo desacoplamiento del conjunto de las superficies de matriz plantilla y de captura de la iniciación de la reacción, lo cual lleva a la producción de moléculas de salida y transferencia de dichas moléculas de salida, preferiblemente en condiciones definidas y con un mínimo de estrés mecánico a la matriz plantilla original.

El presente problema se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Realizaciones preferidas de la presente invención se proveen por las reivindicaciones dependientes.

Los varios aspectos de la presente invención, a saber, el método y el dispositivo descritos en la presente memoria, representan una invención unificada, dado que todos se definen por características innovadoras e inventivas según la técnica anterior citada. Ha sido en la fecha de presentación desconocida que las micromatrices moleculares pudieron producirse mediante producción y transferencia de una molécula de salida como, por ejemplo, proteína, ADN o ARN, de una superficie plantilla a una superficie de micromatriz de captura sin la ayuda de una capa de membrana posicionada entre las dos superficies. La ausencia de dicha capa de membrana permite el desacoplamiento del inicio de reacción del conjunto del dispositivo y, de esta manera, se proveen varias ventajas, según se describe en la presente memoria. Previamente, se ha creído que el uso de un espacio microfluídico o cámara de incubación entre las superficies plantilla y de captura no era adecuado para la transferencia molecular precisa descrita en la presente memoria. Por lo tanto, ha sido sorprendente que la transferencia de moléculas de salida pudiera ocurrir de manera fiable en un pequeño volumen de fluido sin la necesidad de un soporte de membrana. Todos los aspectos de la invención se basan en y hacen uso del presente principio recientemente desarrollado, por lo tanto, proveen un concepto unificado a los varios aspectos de la invención como, por ejemplo, el método, dispositivo, matriz y sistema.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proveer un método para producir una micromatriz molecular, que comprende

a) proveer una primera superficie de soporte (superficie plantilla), que exhibe una o más moléculas plantilla inmovilizadas en su superficie, y una segunda superficie de soporte opuesta (superficie de captura o micromatriz),

b) producción de una molécula de salida de dicha molécula plantilla mediante un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células,

c) transferencia de dicha molécula de salida a una segunda superficie de soporte mediante fluido entre la primera y segunda superficies de soporte, con una correlación entre la ubicación de las moléculas plantilla en la primera superficie de soporte y el depósito de las correspondientes moléculas de salida en la segunda superficie de soporte, caracterizado por que

d) el montaje de las superficies de soporte en una posición fija en la forma de una cámara de incubación microfluídica formada entre la primera y segunda superficies de soporte separadas opuestas ocurre antes de la iniciación de la etapa b), por medio de lo cual la iniciación de la etapa b) se evita por la ausencia o inactividad de un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células entre las superficies de soporte, en donde la introducción o activación del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células en la cámara de incubación microfluídica lleva a la producción de dicha molécula de salida y permite la transferencia de dicha molécula de salida a dicha segunda superficie de soporte, en donde la cámara de incubación microfluídica no comprende una membrana posicionada entre la primera y segunda superficies de soporte.

Por consiguiente, en la etapa d), el conjunto de las superficies de soporte se desacopla de la iniciación de la etapa b), por medio de lo cual la iniciación de la etapa b) se evita por medios restrictivos extraíbles.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que la iniciación de la etapa b) se evita por las siguientes características, las cuales se comprende que son medios restrictivos extraíbles

- una separación espacial entre la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte, lo cual evita el contacto físico directo de las dos superficies,

- un entorno químico o energético que bloquea el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células como, por ejemplo, valor de pH y/o temperatura, que limita o bloquea la actividad de dicho sistema, y/o

- un campo de fuerza interno o externo, por medio de un campo eléctrico o magnético y/o potencial que bloquea el sistema de reacción enzimática libre de células.

Hasta ahora, sistemas y métodos similares para producir micromatrices han estado limitados por capas de membrana entre las superficies plantilla y de captura. Ha sido sorprendente que el conjunto de las capas plantilla y de captura pudiera lograrse sin necesidad de inducir/iniciar el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células. La adición de medios restrictivos extraíbles al método según se describe más arriba permite que el montaje ocurra de manera fiable sin riesgo de dañar los componentes o iniciación inmediata de la producción de micromatrices, lo cual es, por ejemplo, una desventaja significativa cuando se venden conjuntos o dispositivos prefabricados que comprenden superficies plantilla y de captura ya instaladas. Dichos conjuntos prefabricados con superficies plantilla y/o de captura instaladas son además objeto de la invención.

En el método de la presente invención, la separación espacial entre las superficies de soporte es la cámara de incubación microfluídica (espacio microfluídico) formada entre la primera y segunda superficies de soporte separadas opuestas.

En el método de la presente invención, la cámara de incubación microfluídica no comprende una membrana posicionada entre la primera y segunda superficies de soporte.

Ha sido en la fecha de presentación desconocida que las micromatrices moleculares pudieron producirse mediante producción y transferencia de una molécula de salida como, por ejemplo, proteína, ADN o ARN, de una superficie plantilla a una superficie de micromatriz de captura sin la ayuda de una capa de membrana posicionada entre las dos superficies. Previamente, se ha creído que el uso de un espacio microfluídico o cámara de incubación entre las superficies plantilla y de captura no era adecuado para la transferencia molecular precisa descrita en la presente memoria. Por lo tanto, ha sido sorprendente que la transferencia de moléculas de salida pudiera ocurrir de manera fiable en un pequeño volumen de fluido sin la necesidad de un soporte de membrana.

El término microfluídico se refiere a fluidos distribuidos en pequeñas dimensiones como, por ejemplo, escala submilimétrica, tan pequeñas como unos pocos nanómetros, hasta cientos de nanómetros, hasta unos pocos micrómetros o cientos de micrómetros. Los volúmenes de líquido resultantes son muy pequeños, normalmente en microlitros, nanolitros, picolitros o femtolitros, y permiten un uso muy moderado de reactivos enzimáticos al producir matrices moleculares.

En una realización preferida, el método de la presente invención se caracteriza por que la extracción de los medios restrictivos ocurre por la introducción del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células en la cámara de incubación microfluídica y, de esta manera, se induce la producción de dicha molécula de salida y se permite la transferencia de dicha molécula de salida a dicha segunda superficie de soporte.

En una realización preferida, el método de la presente invención se caracteriza por que la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte se mantienen en una posición fija, opuestas entre sí, preferiblemente mediante un sistema de tensión mecánica o de resorte, antes de la iniciación de la producción de dicha molécula de salida mediante un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células según la etapa b) de la reivindicación 1.

La realización anterior aclara la diferencia sustancial entre la presente invención y métodos previos como, por ejemplo, DAPA, en los cuales el posicionamiento de las superficies de soporte era imposible sin iniciación del método.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el método puede repetirse mediante el uso de una sola primera superficie de soporte múltiples veces para la producción de múltiples micromatrices.

La extracción de la característica de membrana y el reemplazo por el sistema microfluídico ha permitido que superficies plantilla únicas, preferiblemente con bibliotecas de ADN con puntos en su superficie, se usen múltiples veces para la producción de matrices moleculares. Aunque ello parece una mejora menor, la evitación de tener que regenerar matrices de ADN como plantillas ahorra enormes costes y esfuerzo, especialmente con respecto a proyectos a gran escala donde es necesario procesar ensayos de unión proteína-proteína u otros estudios de interacciones moleculares con cientos o miles de matrices. El presente método, por lo tanto, permite un enorme ahorro de coste y provee mayor reproducibilidad para enfoques de alto caudal.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que los medios restrictivos extraíbles se refieren a agentes químicos bloqueantes presentes en la primera y/o segunda superficies de soporte, que bloquean el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células y/o bloquean la unión de la molécula de salida a la segunda superficie de soporte, que puede modificarse y/o extraerse según se requiera para iniciar el método, o agotamiento o restricción de componentes químicos esenciales para el sistema de reacción enzimática libre de células.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el bloqueo del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células se refiere al uso de sustituyentes químicos escindibles por luz fijados a grupos -OH esenciales de componentes de reacción, por medio de lo cual el tratamiento con luz libera el componente de reacción y permite la iniciación de reacción, o la unión y/o captura de componentes de reacción esenciales ya sea a la primera o segunda superficie como, por ejemplo, ATP, sales esenciales o coenzimas como, por ejemplo, vitaminas o iones metálicos, de modo que la iniciación de reacción ocurre solamente tras el llenado o un impulso externo.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que la iniciación de la etapa b) se refiere a la conmutación molecular de moléculas de estado activo a inactivo, o de estado inactivo a activo, mediante

- cambio de pH, que lleva a un cambio funcional en moléculas sensibles al pH, por ejemplo, a través del tratamiento con luz de una superficie cubierta de dióxido de titanio, que lleva a la generación de iones H⁺ y posterior cambio de pH,

- cambio en campos eléctricos y/o magnéticos estáticos y/o dinámicos, que lleva a un cambio en moléculas cargadas, dieléctricas o magnéticas o propiedades de superficie,

- cambio en temperatura, que lleva a un cambio de la estructura o dinámica molecular como, por ejemplo, temperatura reducida que lleva a la inactividad de ADN o ARN polimerasa, por medio de lo cual, tras el calentamiento, ocurre la iniciación de reacción,

- iluminación, que lleva a un cambio de moléculas bloqueadas, fotosensibles o atrapadas por reacciones inducidas por luz como, por ejemplo, uso de sustituyentes químicos escindibles por luz fijados a componentes de reacción esenciales, por medio de lo cual el tratamiento con luz libera el componente de reacción y permite la iniciación de reacción, y/o liberación de compuestos atrapados como, por ejemplo, liberación inducida por luz de biotina atrapada u otras moléculas,

- o una combinación de ellos.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que la molécula plantilla es una molécula de ácido nucleico o tipo ácido nucleico como, por ejemplo, ADN, ARN, ADN genómico, fragmentos de ADN clonados, ADN plasmídico, ADNc o bibliotecas de ADNc, productos PCR, ADN sintético u oligonucleótidos de ADN, ARNm o ARN sintético.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el sistema de reacción enzimática libre de células es

- un sistema de ADN polimerasa o de enzima de amplificación de ADN o enzimático,

- un sistema de ARN polimerasa o de enzima de amplificación de ARN o enzimático,

- un sistema de transcriptasa inversa o de enzima de transcripción de ARN a ADN o enzimático,

- un sistema de síntesis de proteínas o una mezcla de expresión libre de células como, por ejemplo, una mezcla enzimática requerida para la transcripción de ADN a ARN y traducción de ARN a proteína como, por ejemplo, lisado libre de células seleccionado de un sistema procariótico o eucariótico como, por ejemplo, E. coli, origen bacteriano, reticulocitos de conejos, origen en insectos, humano y germen de trigo.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el sistema de reacción enzimática libre de células es ADN polimerasa, las moléculas de salida son ADN y una micromatriz de ADN se genera en la segunda superficie de soporte.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el sistema de reacción enzimática libre de células es ARN polimerasa, las moléculas de salida son ARN y una micromatriz de ARN se genera en la segunda superficie de soporte.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el sistema de reacción enzimática libre de células es una transcriptasa inversa, las moléculas de salida son ADN y una micromatriz de ADN se genera en la segunda superficie de soporte.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que el sistema de reacción enzimática libre de células es un sistema de síntesis de proteínas o una mezcla de expresión libre de células como, por ejemplo, una mezcla enzimática requerida para la transcripción de ADN a ARN y traducción de ARN a proteína, las moléculas de salida son proteína y una micromatriz de proteínas se genera en la segunda superficie de soporte.

La invención además se refiere a un dispositivo para la producción de una micromatriz molecular, preferiblemente para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende

a) una primera superficie de soporte (superficie plantilla) que exhibe una o más moléculas plantilla inmovilizadas en su superficie,

b) una segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz) montada con dicha primera superficie de soporte, en donde dicha segunda superficie de soporte está previamente recubierta con un agente de inmovilización configurado para fijar, de manera covalente o no covalente, la molécula de salida a la superficie,

c) por medio de lo cual una cámara de incubación microfluídica (espacio microfluídico) se forma entre primera y segunda superficies de soporte opuestas y físicamente separadas para un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células y, de esta manera, se desacopla el conjunto de las superficies de soporte de la iniciación del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células,

d) una entrada y/o salida de fluido en la cámara de incubación,

e) medios para mantener las dos superficies de soporte opuestas en una posición fija, y

f) un espaciador estructurado microfluídico entre la primera y segunda superficies de soporte para mantener la cámara de incubación como un espacio entre las dos superficies de soporte opuestas;

en donde la cámara de incubación microfluídica no comprende una membrana posicionada entre la primera y segunda superficies de soporte.

El dispositivo de la presente invención exhibe todas las características de la invención del método descrito más arriba que proveen un desarrollo innovador e inventivo con respecto a la técnica anterior. El dispositivo permite el desacoplamiento del conjunto e iniciación del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células mediante la cámara microfluidica formada entre las superficies plantilla y de captura. Las superficies se mantienen en separación física, de modo que, tras el llenado con componentes de reacción, se permite la iniciación del método. La construcción de dicho dispositivo es un desarrollo sorprendente en la técnica anterior, teniendo en cuenta que los microfluidicos no se han considerado apropiados para proveer suficiente resolución para la transferencia de moléculas de salida. Ha sido sorprendente que, por ejemplo, la producción de proteínas de una plantilla de ADN llevara a una transferencia comparable, si no mejorada, con el dispositivo de la presente invención en comparación con el sistema DAPA mediante el uso de una membrana. El dispositivo descrito en la presente memoria también lleva a una reducción de tiempo significativa para la transferencia, con exactitud comparable, si no mejorada, y resolución de producción de proteínas y transferencia en la cámara microfluidica.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que el espaciador estructurado microfluidico para mantener la cámara de incubación como un espacio entre las dos superficies de soporte opuestas es una o más células de flujo estructuradas tridimensionalmente (3D), preferiblemente de polímeros sintéticos como, por ejemplo, materiales de polímero de película delgada o polidimetilsiloxano (PDMS). El término polímero sintético se refiere a cualquier polímero sintético u otro material que pueda aplicarse o sea adecuado para la construcción de células de flujo.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que la entrada y/o salida de fluido es adecuada para que el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células se bombee o pipetee hacia y/o fuera de la cámara de incubación.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que la molécula plantilla es cualquiera de las moléculas seleccionadas de una molécula de ácido nucleico o tipo ácido nucleico como, por ejemplo, ADN, ARN, ADN genómico, fragmentos de ADN clonados, ADN plasmídico, ADNc o bibliotecas de ADNc, productos PCR, ADN sintético u oligonucleótidos de ADN, ARNm o ARN sintético.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que la separación espacial entre las superficies de soporte es menor que 100 micrómetros de altura, preferiblemente de menos de 80 micrómetros como, por ejemplo, 65 micrómetros, preferiblemente de menos de 60 micrómetros, o más preferiblemente de menos de 40 micrómetros como, por ejemplo, 20 micrómetros y menos.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que dichas primera y segunda superficies de soporte son un polímero o membrana de vidrio, plástico, nylon u otro tipo de polímero o membrana natural o sintética, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS).

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que la primera y/o segunda superficies de soporte son un portaobjetos de vidrio estándar para su uso en microscopía como, por ejemplo, con dimensiones de 76 x 26 x 1 mm³. Pequeñas desviaciones en dichas dimensiones también caen dentro del alcance de la invención, como es conocimiento común para una persona con experiencia en la técnica.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que el dispositivo es de tamaño portátil, preferiblemente de 60-140 mm, 80-120 mm o más preferiblemente de 105 mm de longitud, y preferiblemente de 30-90 mm, 40-80 mm, o más preferiblemente de 60 mm de ancho.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que los medios para mantener las dos superficies de soporte opuestas en una posición fija se refieren a soportes de montaje (soportes), posicionados ya sea como soportes superiores, inferiores o laterales, posicionados en relación con las dos superficies de soporte.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que las superficies de soporte o los soportes de montaje (soportes) se mantienen en el lugar mediante tensión mecánica, magnetismo, un sistema de resorte, raíles guía para las superficies y, de esta manera, se mantienen las dos superficies de soporte en una posición fija.

En el dispositivo de la presente invención, dicha segunda superficie de soporte está precubierta de un agente de inmovilización configurado para fijar, de manera covalente o no covalente, la molécula de salida a la superficie.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que el agente de inmovilización es un agente de inmovilización de proteínas como, por ejemplo, un anticuerpo, configurado para fijar, de manera covalente o no covalente, a la proteína expresada, una secuencia de polihistidinas como, por ejemplo, hexahistidina, por medio de lo cual dicho agente de inmovilización de proteínas es un agente quelante como, por ejemplo, Ni-NTA, un péptido, dominio o proteína, por medio de lo cual dicho agente de inmovilización de proteínas es un anticuerpo específico a dicha etiqueta y/o una molécula de unión a la biotina como, por ejemplo, avidina.

En una realización, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que la primera superficie de soporte es

- una micromatriz de ácidos nucleicos o moléculas tipo ácido nucleico,
- un chip de secuenciación que exhibe ácidos nucleicos,
- una distribución espacialmente definida de ácidos nucleicos en una superficie,
- una distribución espacialmente definida de ácidos nucleicos en una matriz de microesferas o una superficie estructurada,
- una distribución espacialmente definida de material líquido o sólido que contiene ácidos nucleicos.

En la presente memoria también se describe, pero no es parte de la invención actualmente reivindicada, un sistema para la producción de una micromatriz molecular, que comprende

- a) primera superficie de soporte (superficie plantilla) que exhibe una o más moléculas plantilla inmovilizadas en su superficie,
- b) una segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz) montada con dicha primera superficie de soporte, por medio de lo cual una cámara de incubación microfluídica (espacio microfluídico) se forma entre la primera (plantilla) y segunda (de captura o micromatriz) superficies de soporte físicamente separadas y opuestas,
- c) una entrada y/o salida de fluido en la cámara de incubación,
- d) medios para mantener las dos superficies de soporte opuestas en una posición fija, y
- e) medios para mantener la cámara de incubación como un espacio entre las dos superficies de soporte opuestas, por medio de lo cual
- f) una micromatriz se forma por la producción de una molécula de salida de la molécula plantilla y transferencia de dicha molécula de salida a la superficie de la segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz) después de la introducción del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células en la cámara de incubación microfluídica y, de esta manera, se induce la producción y transferencia de dicha molécula de salida a dicha segunda superficie de soporte.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El dispositivo y método según se describen en la presente memoria eliminan varias de las desventajas de la última tecnología y pueden usarse preferiblemente para la fabricación de matrices de proteínas, ADN y ARN.

La invención representa una mejora del "sistema DAPA" (sistema de matriz de ADN a matriz de proteínas) para generar copias de matrices de proteínas a partir de una micromatriz de ADN original [1]. La invención permite en la misma manera copiar una matriz de ADN original en una matriz de ADN duplicada (mediante el uso de ADN polimerasa o cualquier otra replicación de ADN o enzima de amplificación), en una matriz de ARN (mediante el uso de ARN polimerasa) o en una matriz de proteínas (mediante el uso de un sistema enzimático similar al sistema DAPA). La invención permite el copiado de matrices de ARN originales en matrices de ADN (mediante el uso de transcriptasa inversa) o en matrices de proteínas (mediante el uso de un sistema enzimático similar al sistema DAPA).

La invención se refiere, en particular, a la provisión de una estructura y disposición únicas del dispositivo y a un proceso innovador. En primer lugar, la primera superficie de soporte, que contiene la micromatriz original, y la segunda superficie, que posteriormente "captura" la copia, se encuentran separadas por un espacio delgado llamado microfluídico. Dicho espacio microfluídico contiene, preferiblemente, aire antes de la iniciación del método, lo cual evita el inicio de la reacción y, tras el llenado con una mezcla de amplificación, se inicia el método. Como tal, dicha disposición tiene dos ventajas con respecto a la última tecnología. En primer lugar, no hay contacto físico entre superficies, lo cual evita la abrasión o el estrés mecánico. En segundo lugar, permite el montaje del dispositivo sin iniciar la reacción. Como tal, el montaje y el inicio de reacción se desacoplan, lo cual permite una orientación de proceso más detallada, por ejemplo, pueden iniciarse, de forma simultánea, reacciones paralelas con mayor facilidad que según los métodos y dispositivos de la técnica anterior.

Dependiendo de las diferentes disposiciones, la primera superficie de soporte (superficie plantilla, micromatriz de ADN) y/o la segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz, copia de micromatriz de proteínas) pueden también contener una microestructura para producir el propio espacio microfluídico (completa o parcialmente o ayudándolo) o un espaciador puede disponerse entre la superficie primaria y secundaria para producir el espacio microfluídico. Dicha estructura en una superficie o un espaciador permitirá la aplicación de al menos una micromatriz en el formato de un portaobjetos de microscopio estándar.

Además, las estructuras microfluídicas pueden exhibir contacto en posiciones altamente definidas en la matriz de ADN, así como en la superficie de captura y definen, como tales, microcavidades que restringen la difusión en una manera definida. Con dicha orientación microfluídica, la difusión de las moléculas de salida puede también guiarse y la creación

de estructuras más altamente definidas, más pequeñas y más marcadas en comparación con el sistema DAPA pueden llevarse a cabo.

Una ventaja adicional de la presente invención en comparación con aquellas conocidas en la técnica como, por ejemplo, DAPA, es la reducción en la cantidad y/o volumen del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células requerido para llevar a cabo el método. El remojo de una membrana en una mezcla de reacción enzimática libre de células (como en DAPA) requiere grandes volúmenes de dicha mezcla y, por lo tanto, es de coste elevado. Los pequeños volúmenes de la cámara de reacción del dispositivo de la presente invención permiten una reducción significativa en la cantidad de mezcla de reacción desechable requerida y, por lo tanto, llevan a una reducción de coste significativa.

10 FIGURAS

Las figuras muestran varias aplicaciones del método y dispositivo de la presente invención.

En la disposición preferida, el montaje se lleva a cabo mediante fijación del espaciador entre las matrices (primera y segunda superficies).

15 Dependiendo del sistema enzimático llenado en el espacio microfluídico, es posible generar micromatrices de ADN o ARN en lugar de micromatrices de proteínas. Con un sistema enzimático correspondiente como una polimerasa de ácido nucleico, es posible generar ADN o ARN derivado de los ácidos nucleicos en la matriz primaria.

Figura 1: Disposición para DAPA, diseño 1 y diseño 2 de la presente invención (vista lateral y vista superior), que muestran varias posiciones de la entrada y/o salida en relación con el espaciador y superficies de soporte.

20 Figura 2: Diseño 1 para un dispositivo portátil (vista en perspectiva), incluidos soportes de montaje (soportes) superior, inferior y lateral, además de un espaciador entre la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte.

Figura 3: Diseño 2 para un dispositivo portátil (vista en perspectiva), incluidos soportes de montaje con elementos de tornillos.

Figura 4: Prototipo 1 (vista lateral y vista superior) que muestra elementos de cierre/sellado, el llenado ocurre a través de una superficie.

25 Figura 5: Prototipo 2 (vista lateral, vista superior y vista en perspectiva), que ilustra la construcción y montaje de las superficies de soporte, espaciador, cámara, entrada y/o salida, por medio de los cuales el llenado ocurre a través del lado, entre las superficies.

Figura 6: Prototipo 3 (vista lateral), con elemento de Peltier y ventana de visualización; análogo al prototipo 1, pero compatible a una estación de llenado automatizado o un cartucho de mantenimiento.

30 Figura 7: Prototipo 4 (vista lateral y vista en perspectiva), que muestra una construcción que incorpora una microestructura integrada (como una combinación de 1 y 4 (primera superficie de soporte y espaciador)), construida con PDMS, por medio de la cual la matriz de ADN se muestra y el dispositivo comprende una portadora reforzada de material sintético (plástico) y un borde elevado para el sellado (borde de sellado, que también puede fijarse mediante adhesivo) del dispositivo.

35 Figura 8: Prototipo 5 (vista lateral y vista en perspectiva), que muestra una disposición alternativa de los elementos de entrada y/o salida, además de estructuras de inserción, caracterizado por un espaciador microfluídico estructurado.

Figura 9: Diseños adicionales de cámaras fluidicas (vista superior), que muestran disposiciones de entrada y/o salida alternativas, soporte PDMS, canales fluidicos con múltiples ramificaciones para el llenado rápido y homogéneo.

40 Figura 10: Vista en perspectiva de una construcción de célula de flujo según el dispositivo de la presente invención, que demuestra una construcción en bisagra para la fijación de dos superficies de soporte con cámara microfluídica, incluida una línea de suministro para la entrada/salida.

45 Figura 11: Vista en perspectiva y superior de una construcción de fijación utilizada para fijar las dos superficies de soporte en una construcción fiable y estable, y para sellar la cámara microfluídica. Un sistema de tornillo (tensión mecánica) se muestra para el montaje de soportes de montaje superiores, inferiores y laterales (soportes), además de elementos de tornillos, por medio de los cuales también se muestra la célula de flujo integrada con línea de suministro.

Figura 12: Equipo de estación de fundición, (a) oblea con microestructura TMMF; (b) oblea colocada en estructura de fundición centrífuga, (c) fundición separada.

50 Figura 13: Producción de ácido nucleico plantilla para la primera superficie de soporte, (a) ADN listo para expresión con el conjunto de plantilla lineal de Qiagen; se designan iniciadores de adaptador con secuencias de promotores, RBS, codones de arranque/parada y etiquetas con secuencias superpuestas a la secuencia de codificación. (b) La

electroforesis en gel resulta de varias secuencias de ADN amplificadas listas para la expresión. Las líneas 1, 9 y 16 muestran una a escalera, las líneas 2, 3 y 4 representan controles negativos, las líneas 5, 2, 8 y 10-14 representan varias secuencias de codificación amplificadas que se usarán como ADN plantilla en una producción de proteína para la micromatriz.

- 5 Figura 14: Matrices de proteínas; micromatrices de proteínas construidas con plantillas de ADNer en células de flujo PDMS (a - d) y portaobjetos de vidrio de epoxi (e + f), con puntos mediante un plóter gesim, un dispositivo portátil (a - d) respectivamente en el sistema DAPA original (e + f). Se ha permitido que la expresión libre de células ocurra y posteriormente los portaobjetos de proteínas se han etiquetado con anticuerpos marcados Cy3 y Cy5. Los tiempos de incubación son como se describe en el texto, a 37°C.
- 10 **Leyenda para figuras:**
- 1 Primera superficie de soporte (superficie plantilla, lleva una o más moléculas plantilla como, por ejemplo, ácido nucleico)
- 2 Separación espacial entre la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte, que contiene, preferiblemente, el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células)
- 15 2a Membrana en sistema DPA
- 2b Cámara de incubación (micro)fluídica (espacio microfluídico)
- 3 Segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz), sobre la cual las moléculas generadas se disponen en matrices
- 4 Espaciador entre la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte, que evita el contacto físico directo de las dos superficies, que se dispone entre 1 y 3 o se integra allí
- 20 5 Entrada y/o salida de fluido para llenar, vaciar y/o retirar aire
- 6 Estructuras microfluídicas con microcanales para el fluido
- 7 Soporte de montaje superior (soporte)
- 8 Soporte de montaje inferior (soporte)
- 25 9 Soporte de montaje lateral (soporte)
- 10 Cierre para sellado y/o sujeción
- 11 Elemento de tornillo
- 12 Elemento de Peltier
- 13 Microestructura integrada como una combinación de 1 y 4
- 30 14 Línea de suministro
- 15 PDMS
- 16 Ventana de detección
- 17 Montaje de abrazadera (soporte de abrazadera) para fijar y/o bloquear la construcción
- 18 Abertura (agujero perforado) con manguera de conexión
- 35 19 Matriz de ADN
- 20 Portadora reforzada de material sintético (plástico)
- 21 Borde elevado para el sellado (borde de sellado)
- 22 Estructuras de inserción para el sellado de la superficie
- 23 Soporte en PDMS para reducir el riesgo de colapso de PDMS elástico
- 40 24 Canales fluidicos de múltiples ramificaciones para el llenado homogéneo y rápido
- 25 Bisagra

26 Soportes de montaje

27 Medios para inducir la tensión para el sellado

Ejemplos

Ejemplos de aplicación para copias de ADN a proteína

5 Se han construido prototipos que usan, en lugar de una membrana, un espacio microfluídico. El presente espacio microfluídico puede llenarse con líquido mediante fuerzas capilares. Un espaciador de 65 µm de grosor permite en el prototipo 1 (diseño 1) y 2 (diseño 2), Figuras 1 a 5, una distancia definida entre la primera y segunda superficies y una orientación fluidica del sistema de expresión libre de células mientras lo llena. Dicho dispositivo portátil permite un montaje fácil y rápido y dos portaobjetos para microscopio inmovilizados uno sobre otro. Después del montaje
10 completo, la mezcla de expresión libre de células puede inyectarse mediante un orificio en una superficie (prototipo 1) (diseño 1) o en una abertura pequeña en el lado del espaciador (prototipo 2) (diseño 2). En comparación con el sistema DAPA y la disposición de la membrana en las superficies, el presente dispositivo portátil realizado permite un inicio de reacción definido, especialmente con respecto al tiempo de inicio de reacción, así como concentraciones y volúmenes exactos, que pueden no determinarse fácilmente dentro de la propia membrana. La reacción de replicación de
15 proteínas como tal no comienza (como en los sistemas DAPA) en el montaje. Comienza solo si se inyecta la mezcla libre de células. Después de la inyección de la mezcla libre de células, el dispositivo portátil se coloca durante 25 a 45 minutos en un incubador. Debido al pequeño peso de los dispositivos y, por lo tanto, a la baja capacidad térmica, alcanza las temperaturas de reacción deseadas muy rápidamente. Después del tiempo de incubación, las superficies de micromatriz se dividen la una de la otra y las matrices se lavan. Se han logrado resultados positivos que muestran matrices comparables y, en muchos casos, mejoradas en comparación con matrices DAPA.

El prototipo 3, Figura 6, es un cartucho más complejo, que puede integrarse en un dispositivo de canalización de fluido. Permite el control térmico del fluido por un elemento de Peltier desde un lado. Ello permite el ajuste de cualquier temperatura o perfil de temperatura deseado. Además, el lado donde se genera la matriz (matriz de proteínas) es ópticamente libre, lo cual significa que será posible monitorear la síntesis de proteínas directamente. El prototipo
25 conectado puede llenarse mediante bomba de jeringa, pero también vaciarse o lavarse.

El prototipo 4, Figura 7, está hecho de plástico tipo PDMS y es una estructura en la cual la micromatriz de ADN se dispone en puntos. La estructura está enmarcada por una estructura delgada (algunas décimas de micrómetro de altura), que rodea todo el volumen de reacción. Contiene también las líneas de entrada y salida para llevar los líquidos dentro y fuera. La segunda superficie (micromatriz de proteínas) es un portaobjetos de vidrio para microscopio.
30 Mediante la simple "fijación" en el portaobjetos de vidrio, PDMS forma un espacio microfluídico con la presente superficie. Mediante las entradas y salidas, toda la construcción puede llenarse con líquido. Simples abrazaderas sujetan las matrices una a la otra para el momento de la reacción.

Una disposición análoga idéntica puede también llevarse a cabo en el lado de la segunda superficie (micromatriz de proteínas). Para la presente disposición, PDMS tiene que recubrirse con un "sistema de recogida de proteínas" que puede ser, preferiblemente, Níquel-NTA. La primera superficie (micromatriz de ADN) será un portaobjetos para microscopio plano.
35

El prototipo 5, Figura 8, es una estructura de PDMS, en la cual la segunda superficie (micromatriz de proteínas) así como la primera superficie (micromatriz de ADN) se deslizan mediante mecánica tipo cajón. PDMS y ambos vidrios forman, juntos, el espacio microfluídico. El presente prototipo es favorable debido al hecho de que las entradas y salidas se llevan a cabo dentro de PDMS (que lleva a una menor probabilidad de fuga) y ambas superficies, la primera (ADN) y segunda superficie (micromatriz de proteínas) se llevan a cabo en una manera de vidrio de microscopio estándar (sin necesidad de superficies especiales de micromatrices de proteínas y/o ADN estructuradas y, por lo tanto, aceptación más alta de los usuarios en el laboratorio).

La Figura 9 muestra cómo puede llevarse a cabo el microfluídico con diferentes disposiciones de los espaciadores. El espaciador que lleva a cabo el espacio microfluídico provee las ventajas adicionales:
45

La primera (micromatriz de ADN) y segunda superficies (micromatriz de proteínas) se encuentran separadas por un espacio microfluídico. No hay contacto físico "duro" entre la primera y segunda superficies, lo cual prohíbe el estrés mecánico, la abrasión y rasguños. Ello garantiza una vida útil prolongada de la micromatriz de ADN y eleva la calidad de las copias de micromatriz de proteínas.

50 El montaje del dispositivo y el inicio de reacción se desacoplan. Ello permite un montaje en cualquier momento y un inicio de reacción en cualquier otro punto temporal posterior, lo cual significa un control preciso de la reacción. Las presentes ventajas en el manejo y orientación de proceso (desacoplamiento de montaje e inicio de reacción) permiten mejores condiciones de reacción más reproducibles, así como un inicio de reacción a demanda. El montaje más fácil (en comparación con el sistema DAPA) puede llevarse a cabo por:

55 una microestructura en la primera superficie (matriz de ADN),

una microestructura en la segunda superficie (matriz de proteínas)

o un espaciador microestructurado, que se dispone entre ambas superficies (disposición de aplicación preferida, y característica obligatoria del dispositivo reivindicado).

En el caso del espaciador, ambas superficies pueden llevarse a cabo en el formato de un portaobjetos para microscopio estándar y no se necesita sellado adicional alguno. Ello se debe al hecho de que el propio espaciador puede llevarse a cabo como sellado tan pronto como se coloquen las superficies. El presente montaje simple permite un tiempo de procesamiento rápido. Como tal, el tiempo para todo el proceso de manejo desde la adquisición de la micromatriz de ADN hasta la extracción de la micromatriz de proteínas se ha reducido de aproximadamente 3 horas en el sistema DAPA a aproximadamente 30 minutos con el dispositivo portátil de la presente invención. Esta es una reducción significativa del tiempo de ciclo.

Ventajas del dispositivo y métodos son: Reemplazo de la membrana problemática por un espacio microfluídico bajo retención de la funcionalidad total, generación de proteínas, respectivamente generación de ARN, respectivamente generación de ADN, y transferencia de dichas moléculas a la superficie secundaria, especialmente la transferencia de proteínas de la primera micromatriz de ADN a la segunda micromatriz de proteínas, desacoplamiento del montaje del dispositivo e inicio de reacción.

Las siguientes desventajas de los métodos de la última tecnología se han sorteado: Manejo difícil de las membranas remojadas y delgadas, flexión y burbujas de aire mediante colocación de la membrana sobre una superficie, inicio de reacción directo en contacto conforme entre membrana y micromatriz de ADN, abrasión física de la micromatriz de ADN debido al contacto mecánico entre la micromatriz de ADN y la membrana.

Ejemplos de aplicación para copias de ADN a ADN

Según su uso para el copiado de ADN a proteínas, puede llevarse a cabo una configuración correspondiente para la copia de ADN a ADN. Aquí, la superficie primaria contiene, p. ej., ADN, con una secuencia de inicio y fin conocida. La superficie secundaria se recubrirá de manera homogénea (o con estructuras específicas) con secuencia inicial idéntica de iniciadores del ADN de la superficie primaria.

Mediante llenado en una mezcla de amplificación de ADN como ADN polimerasa con iniciadores que se ajustan al extremo conocido del ADN, cada hebra de ADN se amplificará en ADN_c, como en [15]. Mediante calentamiento del sistema, dicho ADN_c se liberará y difundirá lejos del punto de la matriz primaria. Mediante enfriamiento del sistema, el ADN_c liberado se volverá a pegar al punto inicial o interactuará con los iniciadores de la superficie secundaria. Allí, la polimerasa amplificará el ADN_c en el iniciador de la superficie secundaria y generará un ADN_{cc} unido de manera covalente, y, como tal, una replicación idéntica del ADN inicial. Por lo tanto, una copia de micromatriz de ADN positiva de la micromatriz de ADN primaria se lleva a cabo en la superficie secundaria.

Nuevamente, como en la copia de ADN a proteína, el espacio microfluídico puede llevarse a cabo en la primera y/o segunda superficie y/o un espaciador que se posiciona entre ambas superficies. Todas las ventajas de la copia de ADN a proteína también son aplicables aquí. Además, la presente disposición permite que, a partir de una micromatriz de ADN, pueda llevarse a cabo una copia positiva.

Mediante selección de diferentes iniciadores en la segunda superficie o en la mezcla enzimática, también es posible generar una copia negativa. Ello puede llevarse a cabo mediante intercambio del iniciador de superficie en la segunda superficie por la secuencia final y adición de solo una pequeña cantidad de iniciador final a la solución, mientras el iniciador inicial se añade en mayores cantidades.

Ejemplos de aplicación para otras copias

Dependiendo de la mezcla enzimática utilizada, pueden llevarse a cabo diferentes copias:

copia ADN a ADN con cualquier mezcla de amplificación de ADN, p. ej., amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA, por sus siglas en inglés), sistemas de amplificación isotérmica de ADN o NASBA; copia ARN a ADN mediante transcriptasa inversa seguida de una etapa de ligación a la superficie secundaria; copia ADN a ARN con cualquier amplificación de ARN como, p. ej., polimerasa de ARN.

Descripción experimental detallada de copias de ADN a proteína

Los ejemplos experimentales provistos en la presente memoria se refieren a la realización de un simple dispositivo portátil para la producción de micromatrices moleculares a partir de micromatrices de ADN, preferiblemente la producción de micromatrices de proteínas. Portaobjetos de vidrio estándares de 76 x 26 x 1 mm (respectivamente, 75 x 25 x 1 mm, u otras dimensiones similares) se usan como un portaobjetos de portadora para micromatrices de ADN y proteínas. En una realización, el dispositivo para fabricar una micromatriz comprende un espaciador hidrofóbico de aproximadamente 40 micrómetros de grosor. El presente espaciador comprende además una entrada y salida microfluídica y funciona como una cámara de incubación de altura y volumen muy bajos. Un sistema de tensión mecánica finalmente ajustado además permite el intercambio rápido de portaobjetos utilizados para la micromatriz, además de fijar los portaobjetos con posicionamiento fiable. La cámara de incubación puede llenarse manualmente mediante pipeta o mediante dispositivos de bombeo comúnmente usados, por medio de los cuales una mezcla enzimática de sistema de expresión de proteínas libre de células se llena en la cámara de incubación. A través del presente método, pueden fabricarse micromatrices de proteínas en un método rápido y rentable sin complicaciones a partir de micromatrices de ADN. Dichas micromatrices de proteínas se utilizan, en particular, para varios tipos de análisis de proteínas, por ejemplo, interacciones proteína-proteína o proteína-molecular.

La tecnología de micromatriz de proteínas se encuentra de alguna manera detrás de la tecnología establecida para micromatrices de ADN. Uno de los presentes problemas en la producción de micromatrices de proteínas es la generación de proteínas de longitud completa mediante expresión de recombinantes, purificación posterior de proteínas recombinantes y disposición de puntos sobre el portaobjetos. Como alternativas, se encuentran disponibles varios métodos de síntesis química de péptidos in situ, sin embargo, dichos métodos son aplicables principalmente para péptidos cortos y no representan una opción realista para la producción de micromatrices de proteínas de longitud completa.

Los presentes ejemplos experimentales demuestran la síntesis de micromatrices de proteínas de longitud completa a partir de micromatrices de ADN mediante un dispositivo portátil microfluídico robusto. En una realización, se han producido simples prototipos, los cuales se demuestran en las Figuras 1 a) y 1 b). Los prototipos presentados en las figuras representan una mejora con respecto al sistema DAPA conocido en la técnica. El llenado libre de burbujas de la cámara de incubación, además de un sello hermético de la cámara, así como la provisión de una cámara de incubación de volumen muy bajo con el fin de minimizar la difusión lateral de una proteína, se ha desarrollado más y se muestra en los ejemplos adicionales.

Generación de las plantillas de ADN

Con el fin de generar plantillas de ADN listas para la expresión (ADNer) a partir de cualquier secuencia de nucleótidos dada, se ha aplicado el conjunto de plantilla lineal (LTK) de Qiagen. En una primera reacción PCR (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, por sus siglas en inglés), los iniciadores contruidos internamente que exhiben regiones superpuestas de aproximadamente veinte nucleótidos a la plantilla de ADN de codificación, junto con un iniciador de adaptador y secuencia de detección (por ejemplo, etiquetas), se añaden a la hebra de ADN original mediante amplificación. Una segunda reacción PCR utiliza el producto de la primera reacción PCR como una plantilla y extiende el producto ADN por medio del iniciador de adaptador (preferiblemente también con etiquetas añadidas como, por ejemplo, etiquetas His o Strep, y secuencias, que sirven para permitir la unión de una ARN polimerasa (promotor T7) y un lado de inicio de ribosoma (RBS), además de un codón de parada. Con el presente conjunto, las plantillas de ADN se han amplificado listas para la expresión y los resultados se muestran mediante un experimento de electroforesis en gel (Figura 13). El análisis de secuencia de los productos PCR confirma los resultados deseados. Dichos experimentos demuestran que, mediante el conjunto LTK de Qiagen, las plantillas de ADN se extienden con secuencias de etiquetas y se producen como casetes amplificados listos para la expresión.

Optimización del dispositivo portátil

Una de las realizaciones de la invención se refiere a una célula de flujo microfluídico de volumen muy bajo y baja altura, que se basa en el uso de una lámina de poliéster autoadhesiva cortada con láser de aproximadamente 100 micrómetros de grosor, que se fija mediante adhesivo y se cubre posteriormente con otro portaobjetos o cubreobjetos. La presente forma particular de la invención funciona bien, pero también exhibe algunas otras desventajas menores. Por ejemplo, la lámina autoadhesiva es subóptima para la incubación con las plantillas de ADN, las láminas se encuentran disponibles solamente en ciertos grosores, las láminas no exhiben grosores constantes, una estructura tridimensional de la célula de flujo no permite el llenado libre de burbujas y la entrada y salida requieren proveer acceso a través del portaobjetos, lo cual puede ser difícil con vidrio, o a través del lado de la construcción, que puede ser difícil de sellar.

Con el fin de superar dichas desventajas menores, hemos producido dos realizaciones adicionales del dispositivo portátil. Los resultados de los dos dispositivos adicionales ofrecen un llenado mejorado del dispositivo, un sellado absolutamente fiable y una utilidad simple. Una de las variantes usa exclusivamente los portaobjetos de vidrio estándares (76 x 25 x 1 mm³) hechos de vidrio como una estructura portadora, por medio de lo cual la otra realización se basa en una célula de flujo tridimensional estructurada construida con PDMS, en la cual la cámara de incubación de la matriz de ADN se inmoviliza.

Dispositivo portátil con célula de flujo PDMS estructurada

La presente realización comprende un portaobjetos PDMS microestructurado (Figura 7), que se funcionaliza para la inmovilización de las moléculas plantilla de ADN mediante el uso de PDITC. El portaobjetos de PDMS se cubre mediante el uso de un portaobjetos que se recubre con Ni-NTA. El llenado y/o vaciado de la cámara de incubación ocurre mediante una abertura en el portaobjetos de PDMS. El maestro para los portaobjetos de PDMS se muele para formar la forma correcta. Una estación de flujo manual permite el llenado y vaciado de los portaobjetos de PDMS (Figura 12).

Para mejorar el llenado libre de burbujas y la capacidad de sellado, las estructuras previamente descritas se han producido con una laca fotorresistente de película seca (TMMF, 30 / 45 micrómetros de grosor) o líquida SU-8 mediante métodos fotolitográficos (Figura 12a), p. ej., recubrimiento giratorio. La oblea estructurada se ha colocado en un molde de vertido centrífugo para verter los portaobjetos de PDMS (Figura 12c).

Dispositivo portátil para dos portaobjetos de vidrio estándares

El dispositivo según la presente realización pretende usarse con dos portaobjetos de vidrio estándares para ambas micromatrices. El llenado de la cámara de incubación ocurre mediante un canal microfluídico, el cual se forma en un espaciador con superficies de sellado hidrofóbicas y elásticas. El espaciador está hecho de una placa de acero inoxidable recubierta con Teflon (normalmente, 500 nm - 15 micrómetros) de 25 micrómetros de grosor (una alternativa es el uso directo de una lámina de Teflon con un grosor de 30-80 micrómetros). El portaobjetos necesita empujarse con fuerza fuerte contra el espaciador hidrofóbico, con el fin de producir un sello fiable. Un dispositivo para la rápida sustitución de los portaobjetos permite el intercambio rápido y fácil de los varios portaobjetos.

Expresión de proteínas libre de células de matrices de proteínas

Con el fin de evaluar los dos sistemas de expresión eucarióticos libres de células EasyXpress (Qiagen) y RTS100 (5Prime) se han usado con el dispositivo portátil de una célula de flujo de PDMS (cámara de incubación de aproximadamente 60 micrómetros de altura, 2 x 8 mm (Figuras 6 a y b) / 2 x 5 mm (Figuras 6 c + d) y el sistema DAPA original con una membrana (Figuras 6 e + f). Dos plantillas de ADNer se han manchado con un plóter Gesim en la célula de flujo de PDMS y en un portaobjetos de vidrio recubierto con epoxi y expresado posteriormente durante 90/180 minutos (RTS100) respectivamente 40/90 minutos (EasyXpress). Luego, los portaobjetos se han etiquetado con anticuerpos etiquetados anti Cy3/Cy5.

Compendio de ejemplos experimentales

La generación de ADNer mediante el uso de LTK de Qiagen se ha evaluado y demuestra que cualquier plantilla de ADN dada puede amplificarse con una secuencia de iniciador conocida. Los dos sistemas de expresión libres de células examinados EasyXpress y RTS100 también han demostrado resultados positivos. Los dispositivos portátiles desarrollados y sus procesos de fabricación se han probado y han demostrado proveer resultados beneficiosos, demostrando un tiempo de producción de matrices de proteínas en algunos casos de 15-20 minutos. Con una reducción adicional de la altura de cámara, se esperará una reducción del tiempo de producción.

Bibliografía

- [1] M. He, O. Stoevesandt, E. A. Palmer, F. Khan, O. Ericsson, M. J. Taussig, Printing protein arrays from DNA arrays, *Nature Methods*, vol. 5, pp. 175-177, 2008
- [2] H. Chandra, S. Srivastava, Cell-free synthesis-based protein microarrays and their applications, *Proteomics*, vol. 10, pp. 717-730, 2010
- [3] M. Y. He, M. J. Taussig, Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method), *Nucleic Acids Research*, vol. 29, pp. art-e73, 2001
- [4] J. Sobek, K. Bartscherer, A. Jacob, J. D. Hoheisel, P. Angenendt, Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 9, pp. 365-380, 2006
- [5] N. Ramachandran, et al. Self-assembling protein microarrays, *Science*, vol. 305, pp. 86-90, 2004
- [6] N. Ramachandran, S. Srivastava, J. LaBaer, Applications of protein microarrays for biomarker discovery, *Proteomics Clinical Applications*, vol. 2, pp. 1444-1459, 2008
- [7] P. Angenendt, L. Nyarsik, W. Szaflarski, J. Glokler, K. H. Nierhaus, H. Lehrach, D. J. Cahill, A. Lueking, Cell-free protein expression and functional assay in nanowell chip format, *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 1844-1849, 2004
- [8] R. Khnouf, D. J. Beebe, Z. H. Fan, Cell-free protein expression in a microchannel array with passive pumping, *Lab Chip*, vol. 9, pp. 56-61, 2009

- [9] Q. Mei, C. K. Fredrickson, A. Simon, R. Khnouf, Z. H. Fan, Cell-free protein synthesis in microfluidic array devices, *Biotechnology Progress*, vol. 23, pp. 1305-1311, 2007
- [10] T. Kinpara, R. Mizuno, Y. Murakami, M. Kobayashi, S. Yamaura, Q. Hasan, Y. Morita, H. Nakano, T. Yamane, E. Tamiya, A picoliter chamber array for cell-free protein synthesis, *J. Biochem. (Tokyo)*., vol. 136, pp. 149-154, 2004
- 5 [11] A. Kumar, Z. Liang, Chemical nanoprinting - a novel method for fabricating DNA microchips, *Nucleic Acids Res*, vol. 29, pp. e2, 2001
- [12] Q. Du, O. Larsson, H. Swerdlow, Z. Liang, DNA immobilization: Silanized nucleic acids and nanoprinting, 2005, pp. 45-61
- 10 [13] A. A. Yu, G. S. Taylor, A. Guiseppe-Elie, H. I. Smith, F. Stellacci, Supramolecular nanostamping: Using DNA as movable type, *Nano Letters*, vol. 5, pp. 1061-1064, 2005
- [14] S. Kim, G. Lim, S. E. Lee, J. Lee, K. Yun, J. Park, DNA chip replication for a personalized DNA chip, *Biomolecular Engineering*, vol. 23, pp. 129-134, 2006
- [15] J. Kim, R. M. Crooks, Transfer of surface polymerase reaction products to a secondary platform with conservation of spatial registration, *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 12076-12077, 2006

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una micromatriz molecular, que comprende

a) proveer una primera superficie de soporte (superficie plantilla), que exhibe una o más moléculas plantilla inmovilizadas en su superficie, y una segunda superficie de soporte opuesta (superficie de captura o micromatriz),

5 b) producción de una molécula de salida de dicha molécula plantilla mediante un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células,

c) transferencia de dicha molécula de salida a una segunda superficie de soporte mediante fluido entre la primera y segunda superficies de soporte, con una correlación entre la ubicación de las moléculas plantilla en la primera superficie de soporte y el depósito de las correspondientes moléculas de salida en la segunda superficie de soporte,

10 caracterizado por que

d) el montaje de las superficies de soporte en una posición fija en la forma de una cámara de incubación microfluídica formada entre la primera y segunda superficies de soporte separadas opuestas ocurre antes de la iniciación de la etapa b), por medio de lo cual la iniciación de la etapa b) se evita por la ausencia o inactividad de un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células entre las superficies de soporte, en donde la introducción o activación del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células en la cámara de incubación microfluídica lleva a la producción de dicha molécula de salida y permite la transferencia de dicha molécula de salida a dicha segunda superficie de soporte, en donde la cámara de incubación microfluídica no comprende una membrana posicionada entre la primera y segunda superficies de soporte.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la iniciación de la etapa b) se evita por

20 - una separación espacial entre la primera superficie de soporte y la segunda superficie de soporte que contiene aire antes de la iniciación de la etapa b), lo cual evita el contacto físico directo de las dos superficies,

- un entorno químico o energético que bloquea el sistema de reacción química y/o enzimática libre de células como, por ejemplo, valor de pH y/o temperatura, que limita o bloquea la actividad de dicho sistema, o

25 - un campo de fuerza interno o externo, por medio de un campo eléctrico o magnético y/o potencial que bloquea el sistema de reacción enzimática libre de células.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el método puede repetirse mediante el uso de una sola primera superficie de soporte múltiples veces para la producción de múltiples micromatrices.

30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la iniciación de la etapa b) se refiere a la conmutación molecular de moléculas de estado inactivo a activo, mediante

- cambio de pH, que lleva a un cambio funcional en moléculas sensibles al pH, por ejemplo, a través del tratamiento con luz de una superficie cubierta de dióxido de titanio, que lleva a la generación de iones H⁺ y posterior cambio de pH,

35 - cambio en campos eléctricos y/o magnéticos estáticos y/o dinámicos, que lleva a un cambio en moléculas cargadas, dieléctricas o magnéticas o propiedades de superficie,

- cambio en temperatura, que lleva a un cambio de la estructura molecular o dinámica como, por ejemplo, temperatura reducida, que lleva a la inactividad de ADN o ARN polimerasa, por medio de lo cual, tras el calentamiento, ocurre la iniciación de reacción,

40 - iluminación, que lleva a un cambio de moléculas bloqueadas, fotosensibles o atrapadas por reacciones inducidas por luz como, por ejemplo, sustituyentes químicos escindibles por luz fijados a componentes de reacción esenciales, por medio de lo cual el tratamiento con luz libera el componente de reacción y permite la iniciación de reacción, y/o liberación de compuestos atrapados como, por ejemplo, liberación inducida por luz de biotina atrapada u otras moléculas,

- o una combinación de ellos.

45 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula plantilla es una molécula de ácido nucleico o tipo ácido nucleico como, por ejemplo, ADN, ARN, ADN genómico, fragmentos de ADN clonados, ADN plasmídico, ADNc o bibliotecas de ADNc, productos PCR, ADN sintético u oligonucleótidos de ADN, ARNm o ARN sintético.

50 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el sistema de reacción enzimática libre de células es

- un sistema de ADN polimerasa o de enzima de amplificación de ADN o enzimático,
 - un sistema de ARN polimerasa o de enzima de amplificación de ARN o enzimático,
 - un sistema de transcriptasa inversa o de enzima de transcripción de ARN a ADN o enzimático,
 - un sistema de síntesis de proteínas o una mezcla de expresión libre de células como, por ejemplo, una mezcla enzimática requerida para la transcripción de ADN a ARN y traducción de ARN a proteína como, por ejemplo, lisado libre de células seleccionado de un sistema procariótico o eucariótico como, por ejemplo, E. coli, origen bacteriano, reticulocitos de conejos, origen en insectos, humano y germen de trigo.
- 5
7. Dispositivo para la producción de una micromatriz molecular según el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende
- 10
- a) una primera superficie de soporte (superficie plantilla) que exhibe una o más moléculas plantilla inmovilizadas en su superficie, preferiblemente según la reivindicación 5,
- b) una segunda superficie de soporte (superficie de captura o micromatriz) montada con dicha primera superficie de soporte, en donde dicha segunda superficie de soporte está previamente recubierta con un agente de inmovilización configurado para fijar, de manera covalente o no covalente, la molécula de salida a la superficie,
- 15
- c) por medio de lo cual una cámara de incubación microfluídica se forma entre la primera y segunda superficies de soporte físicamente separadas y opuestas para un sistema de reacción química y/o enzimática libre de células y, de esta manera, se desacopla el conjunto de las superficies de soporte de la iniciación del sistema de reacción química y/o enzimática libre de células,
- d) una entrada y/o salida de fluido en la cámara de incubación,
- 20
- e) medios para mantener las dos superficies de soporte opuestas en una posición fija, y
- f) un espaciador estructurado microfluídico entre la primera y segunda superficies de soporte para mantener la cámara de incubación como un espacio entre las dos superficies de soporte opuestas;
- en donde la cámara de incubación microfluídica no comprende una membrana posicionada entre la primera y segunda superficies de soporte.
- 25
8. Dispositivo según la reivindicación precedente, caracterizado por que
- a. el espaciador estructurado microfluídico para mantener la cámara de incubación como un espacio entre las dos superficies de soporte opuestas es una o más células de flujo estructuradas tridimensionalmente (3D), preferiblemente de polímeros sintéticos como, por ejemplo, materiales de polímero de película fina o polidimetilsiloxano (PDMS).
9. Dispositivo según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que
- 30
- la separación espacial entre las superficies de soporte es menor que 100 micrómetros de altura, preferiblemente de menos de 80 micrómetros como, por ejemplo, 65 micrómetros, preferiblemente de menos de 60 micrómetros, o más preferiblemente de menos de 40 micrómetros como, por ejemplo, 20 micrómetros y menos.
10. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, caracterizado por que
- 35
- dicha primera y segunda superficies de soporte son de vidrio, plástico, nylon u otro tipo de polímero o membrana natural o sintética, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), en donde la primera y/o segunda superficies de soporte son, preferiblemente, un portaobjetos de vidrio adecuado para su uso en microscopía como, por ejemplo, con dimensiones de 76 x 26 x 1 mm³.
11. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, caracterizado por que
- 40
- el dispositivo es de un tamaño portátil, preferiblemente de 60-140 mm, 80-120 mm o más preferiblemente de 105 mm de longitud, y preferiblemente de 30-90 mm, 40-80 mm, o más preferiblemente de 60 mm de ancho.
12. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 7-11, caracterizado por que
- 45
- los medios para mantener las dos superficies de soporte opuestas en una posición fija se refieren a soportes de montaje (soportes), posicionados como soportes superiores, inferiores o laterales, posicionados en relación con las dos superficies de soporte, en donde las superficies de soporte o los soportes de montaje (soportes) se mantienen, preferiblemente, en el lugar mediante tensión mecánica, magnetismo, un sistema de resorte, raíles guía para las superficies y, de esta manera, mantienen las dos superficies de soporte en una posición fija.

13. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, caracterizador por que

dicho agente de inmovilización es un agente de inmovilización de proteínas como, por ejemplo, un anticuerpo, configurado para fijar, de manera covalente o no covalente, a la proteína expresada, una secuencia de polihistidina como, por ejemplo, hexahistidina, por medio de lo cual dicho agente de inmovilización de proteínas es un agente

5 quelante como, por ejemplo, Ni-NTA, un péptido, dominio o proteína, por medio de lo cual dicho agente de inmovilización de proteínas es un anticuerpo específico a dicha etiqueta y/o una molécula de unión a la biotina como, por ejemplo, avidina.

14. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 7-13, caracterizado por que

la primera superficie de soporte es

- 10
- una micromatriz de ácidos nucleicos o moléculas tipo ácido nucleico,
 - un chip de secuenciación que exhibe ácidos nucleicos,
 - una distribución espacialmente definida de ácidos nucleicos en una superficie,
 - una distribución espacialmente definida de ácidos nucleicos en una matriz de microesferas o una superficie estructurada,
- 15
- una distribución espacialmente definida de material líquido o sólido que contiene ácidos nucleicos.

Fig. 1

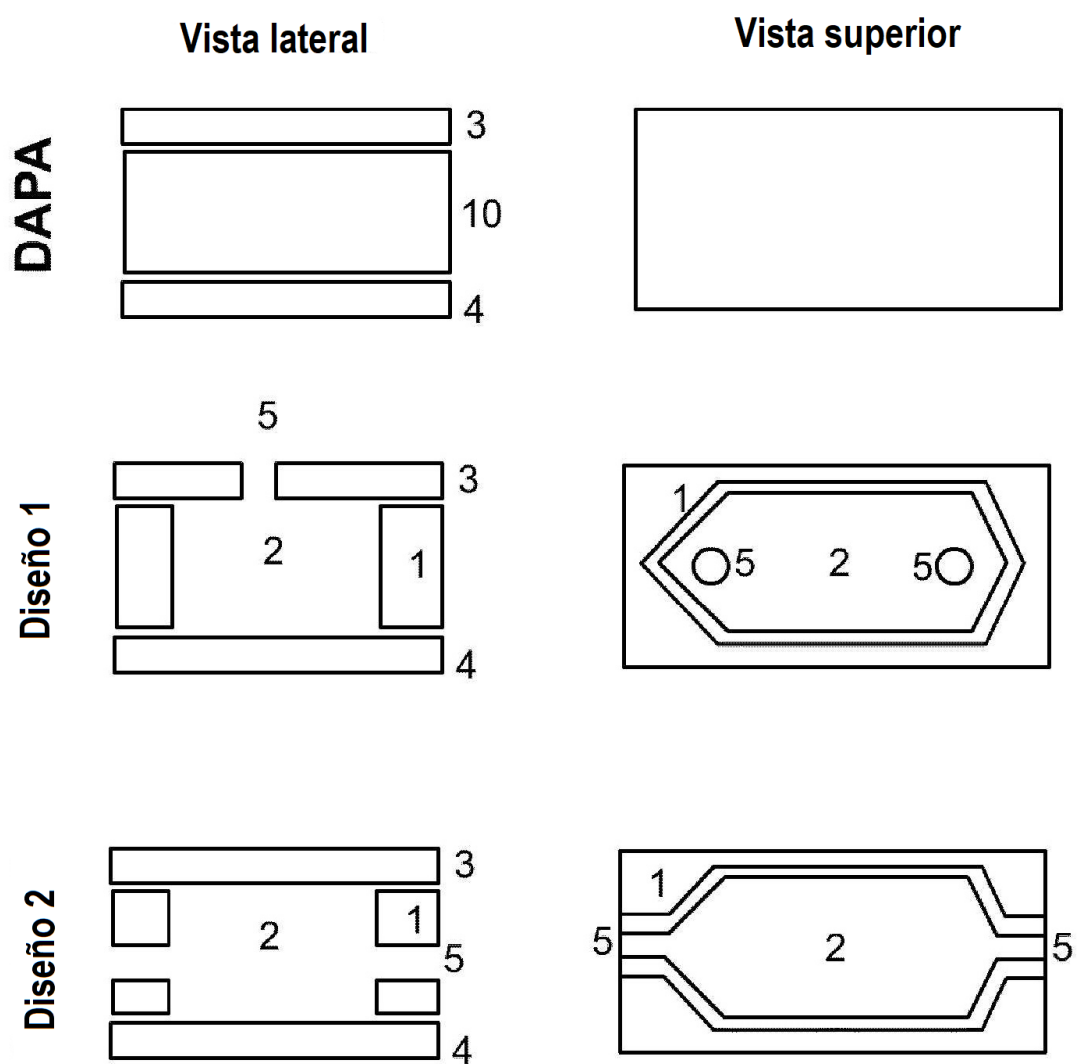


Fig. 2

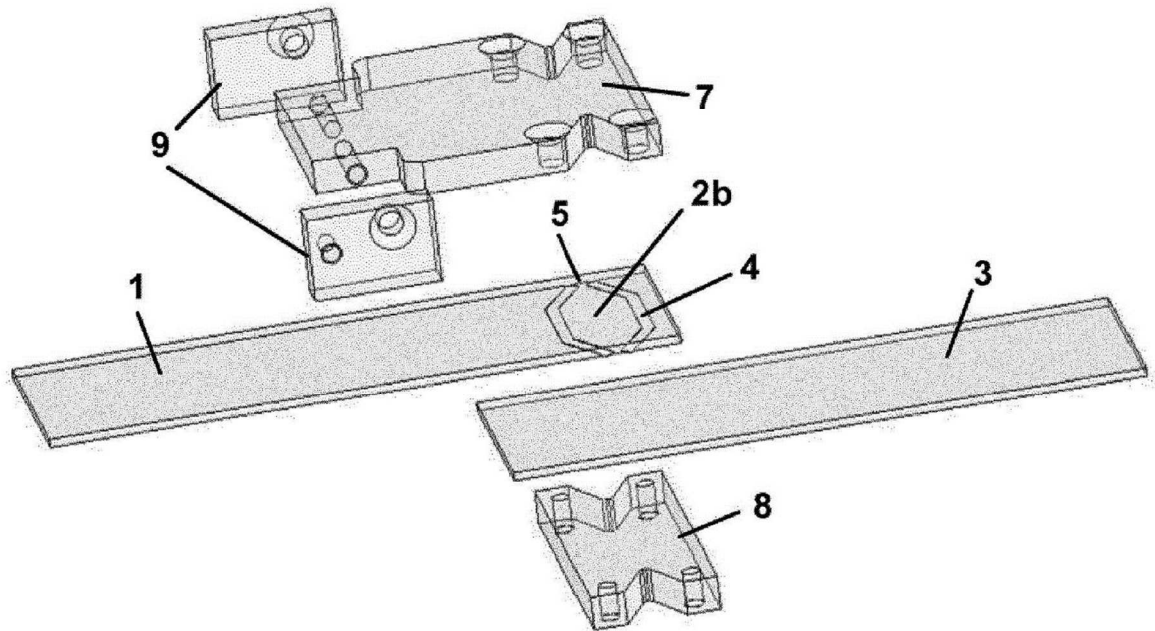


Fig. 3

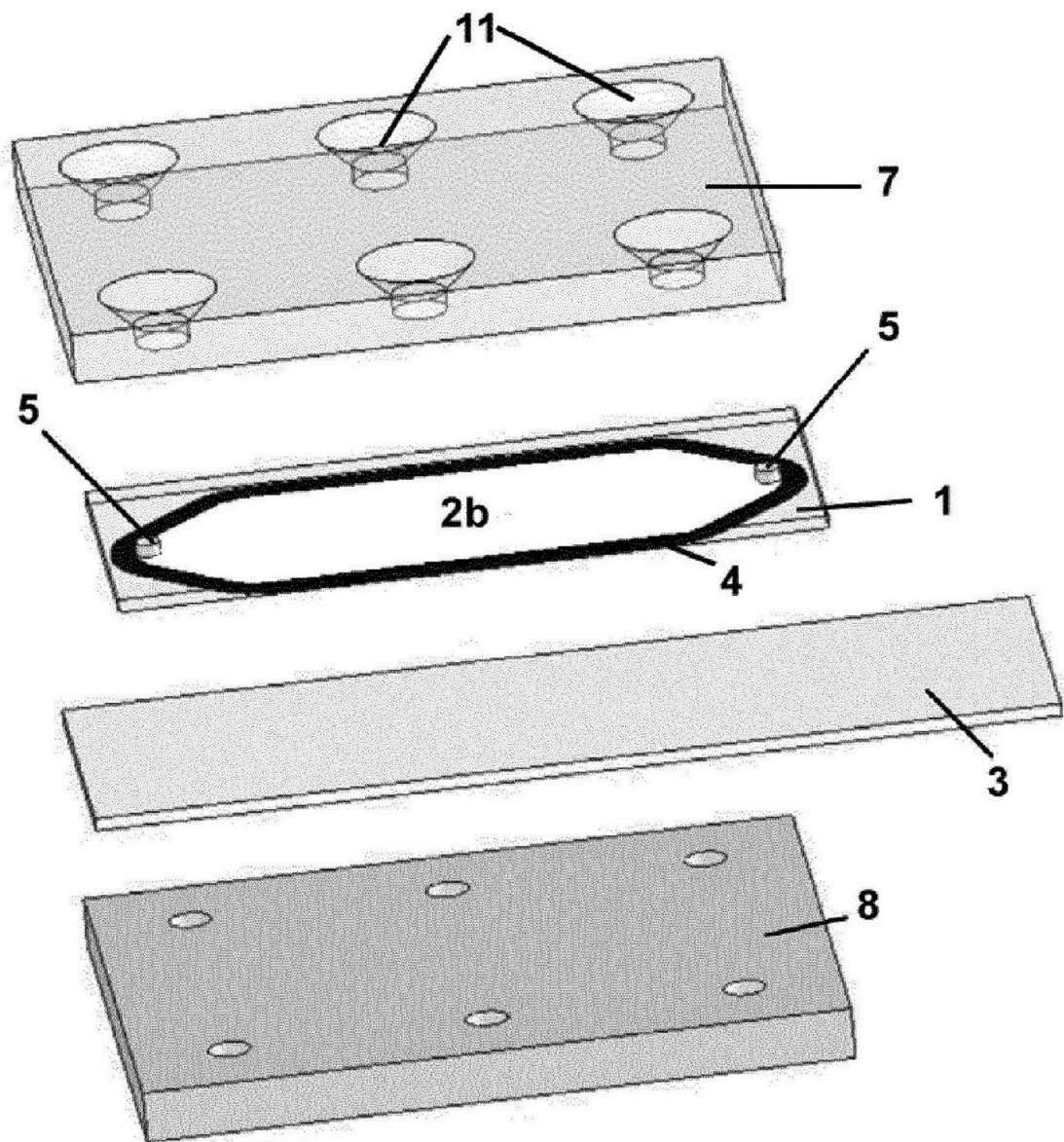


Fig. 4

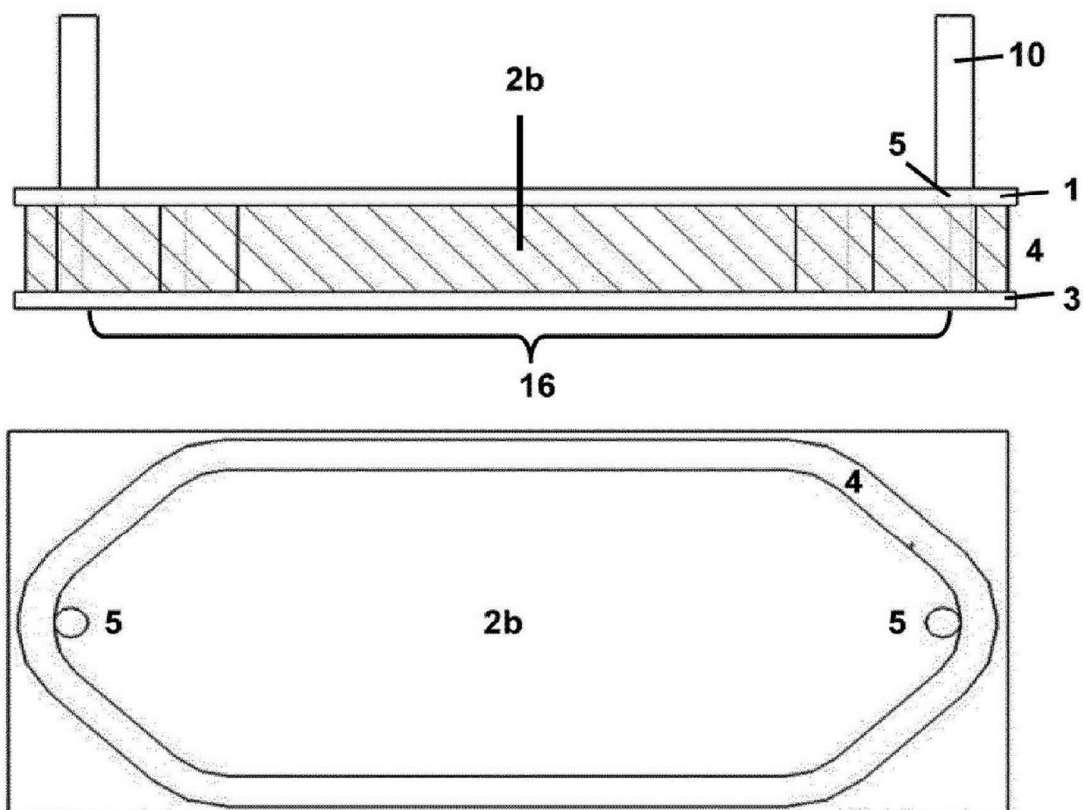


Fig. 5

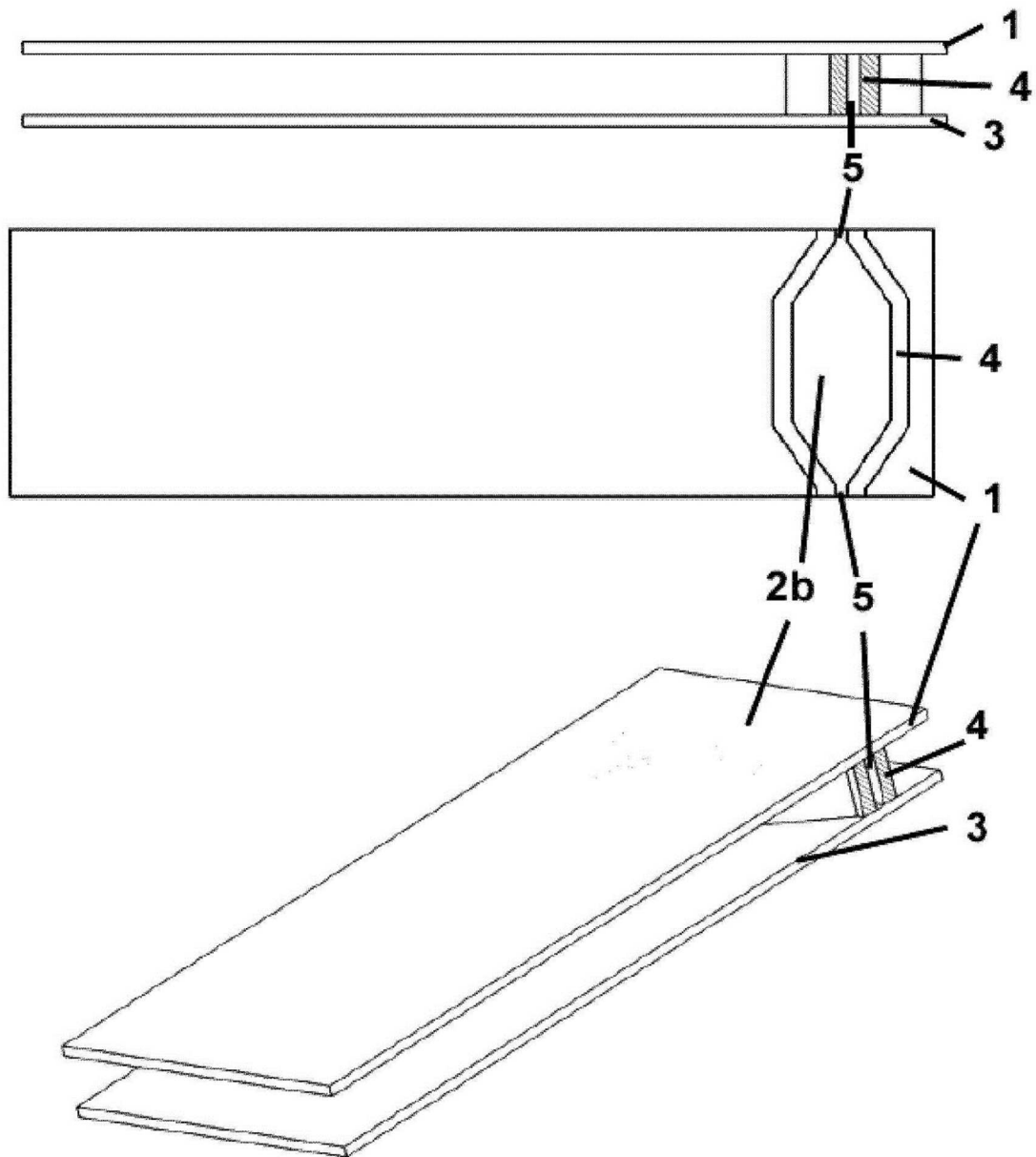


Fig. 6

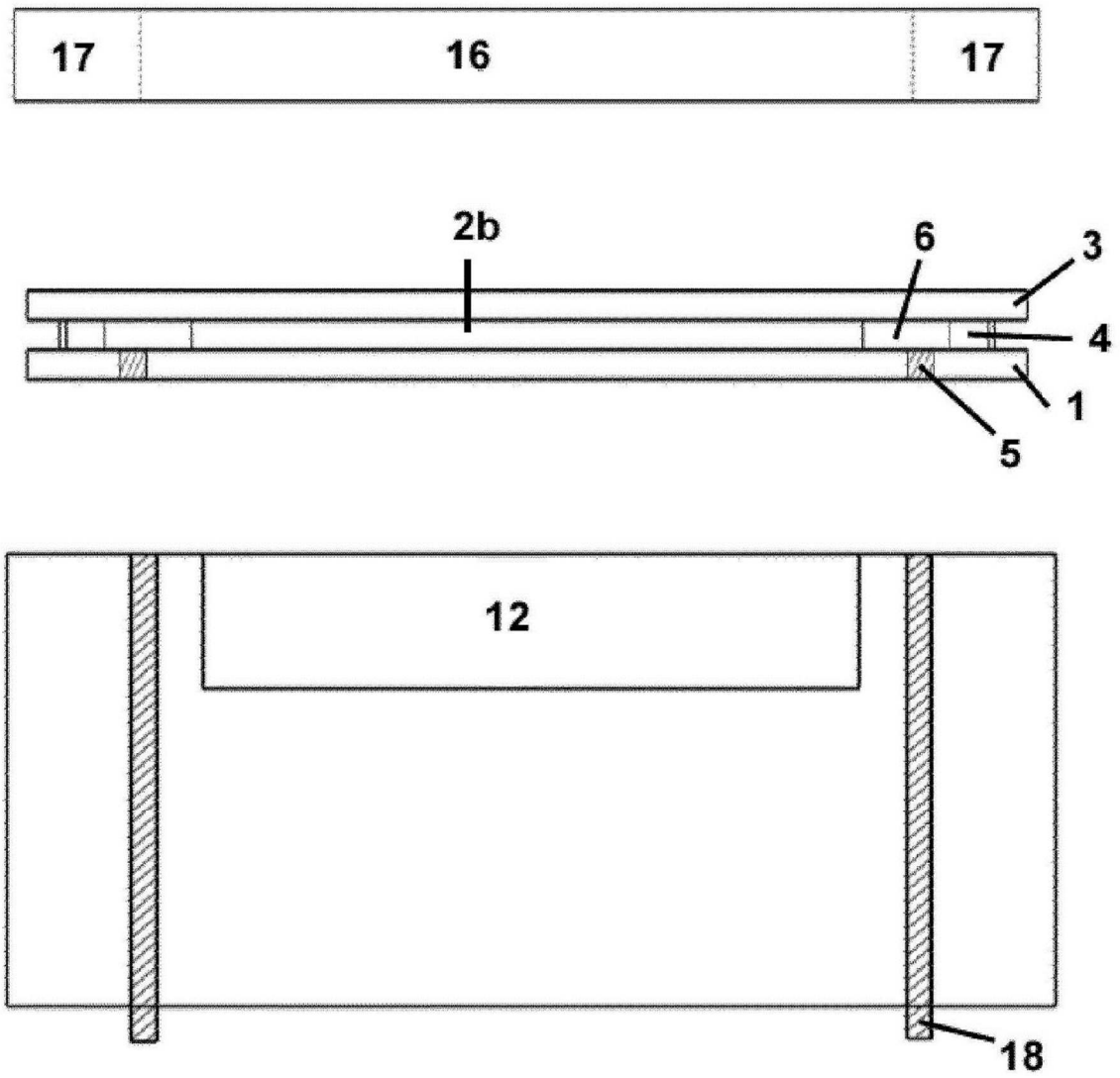


Fig. 7

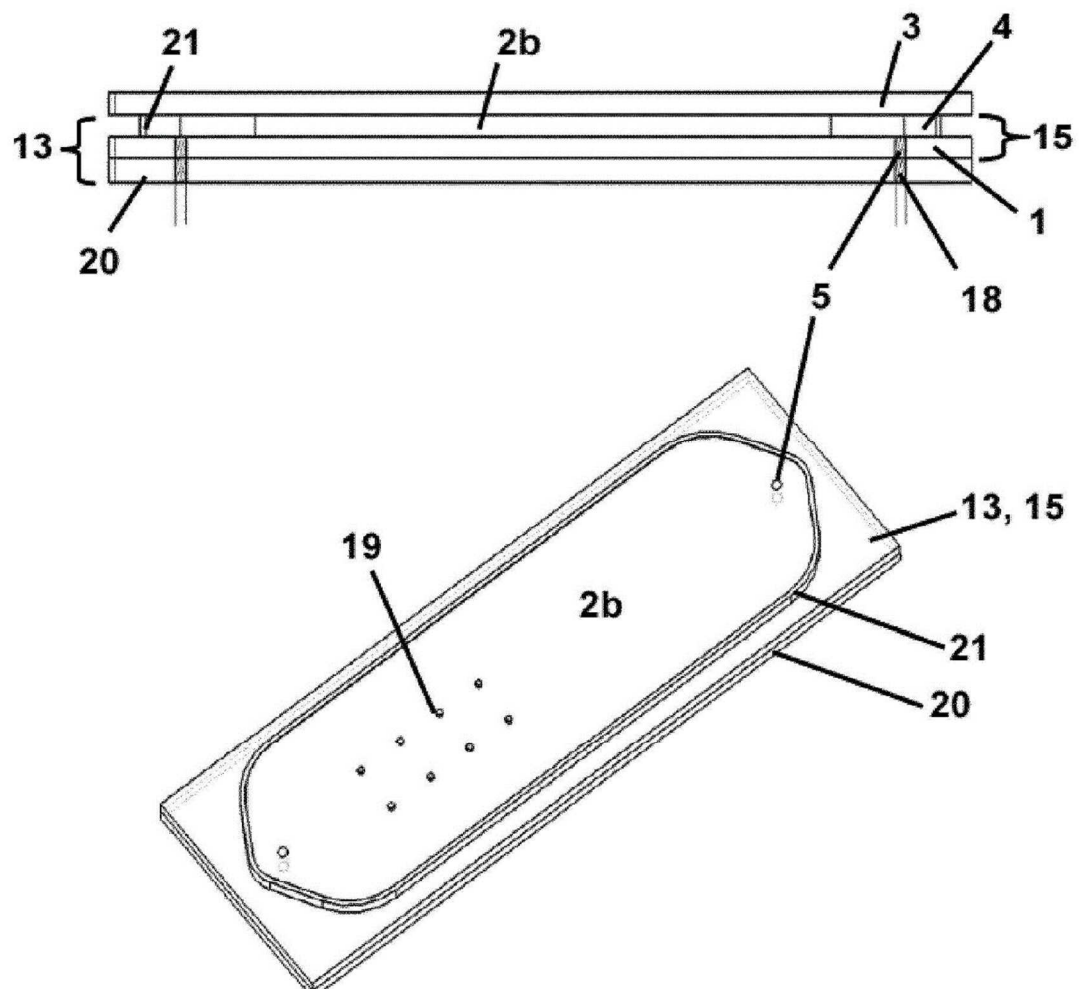


Fig. 8

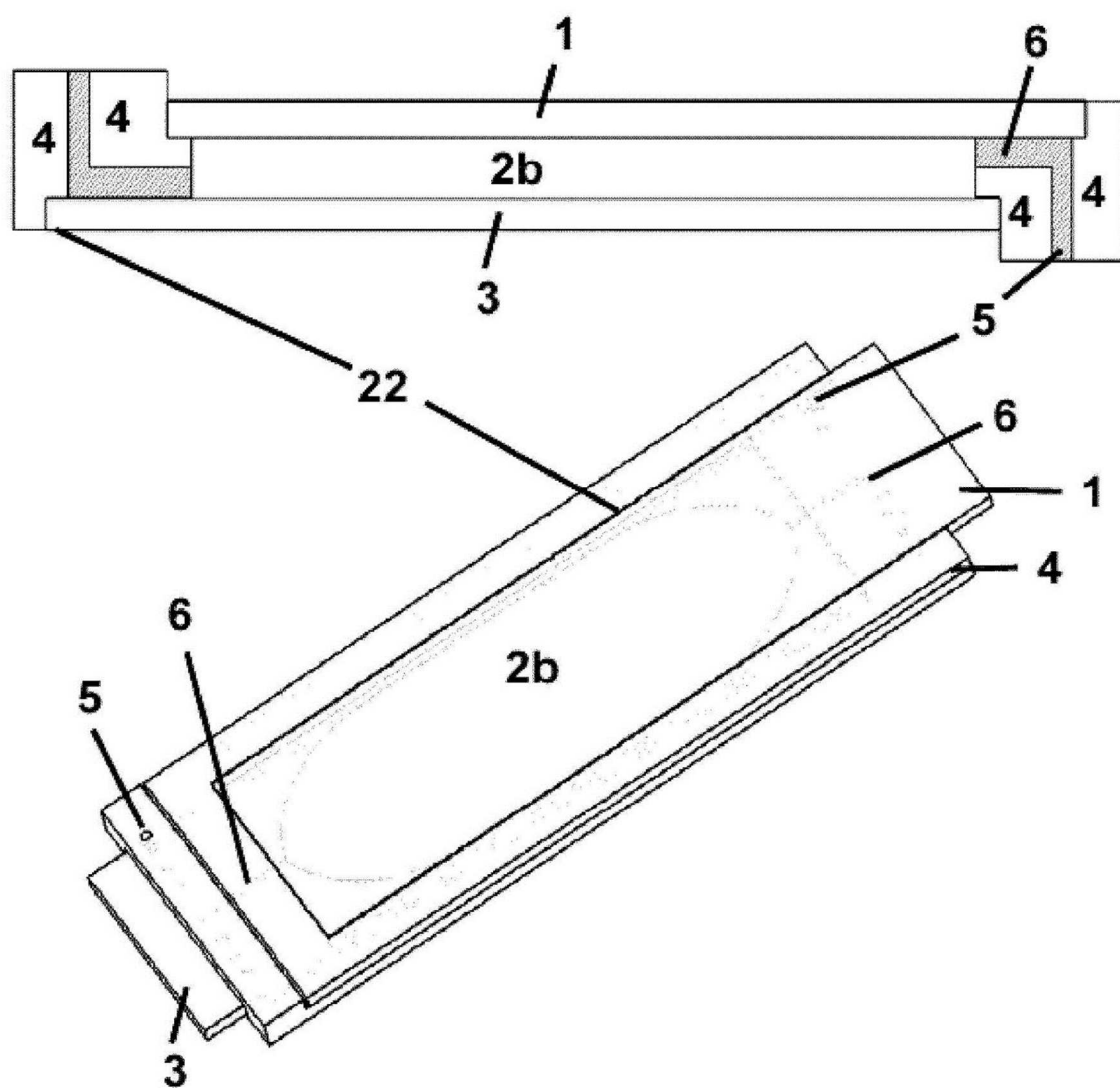


Fig. 9

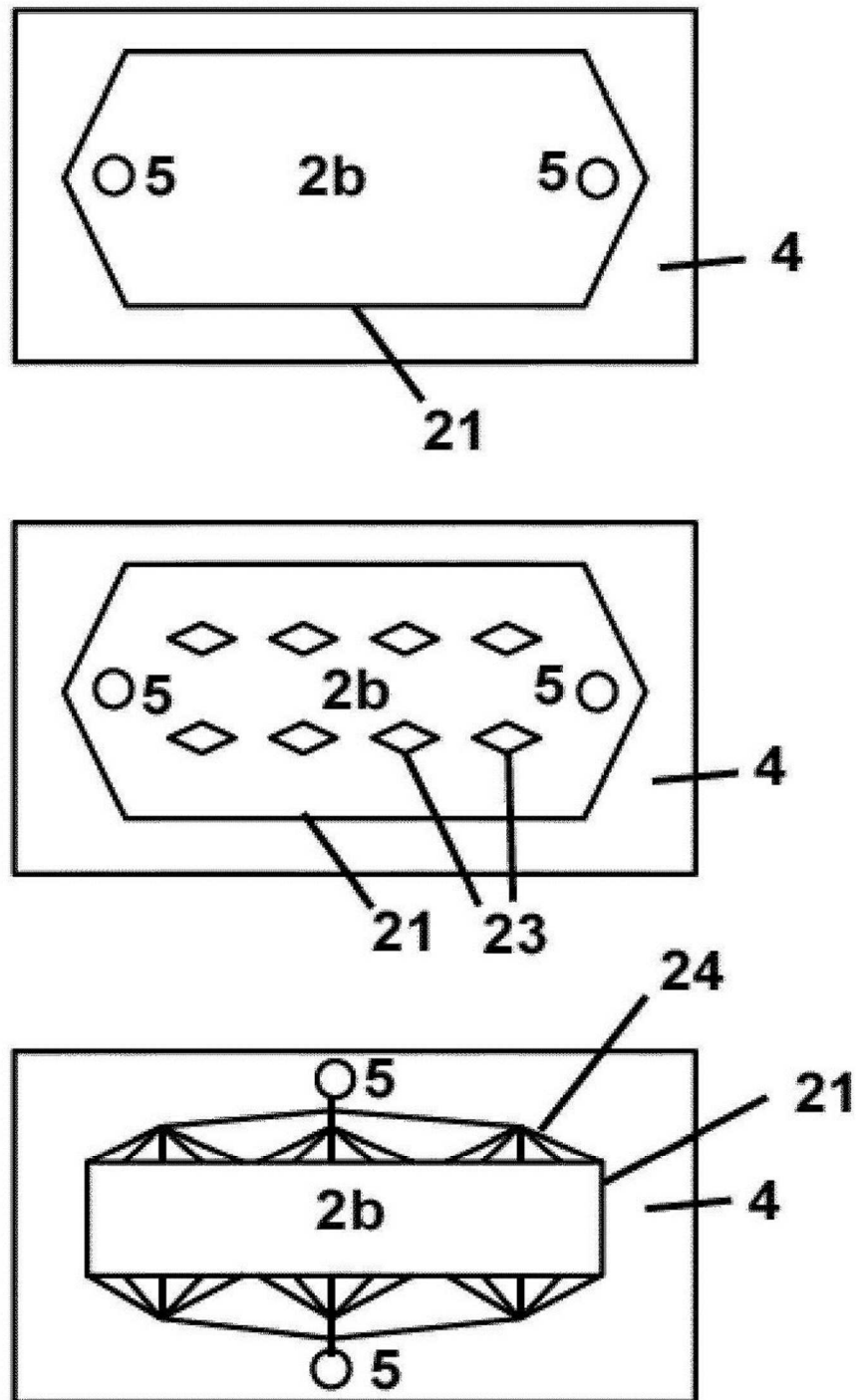


Fig. 10

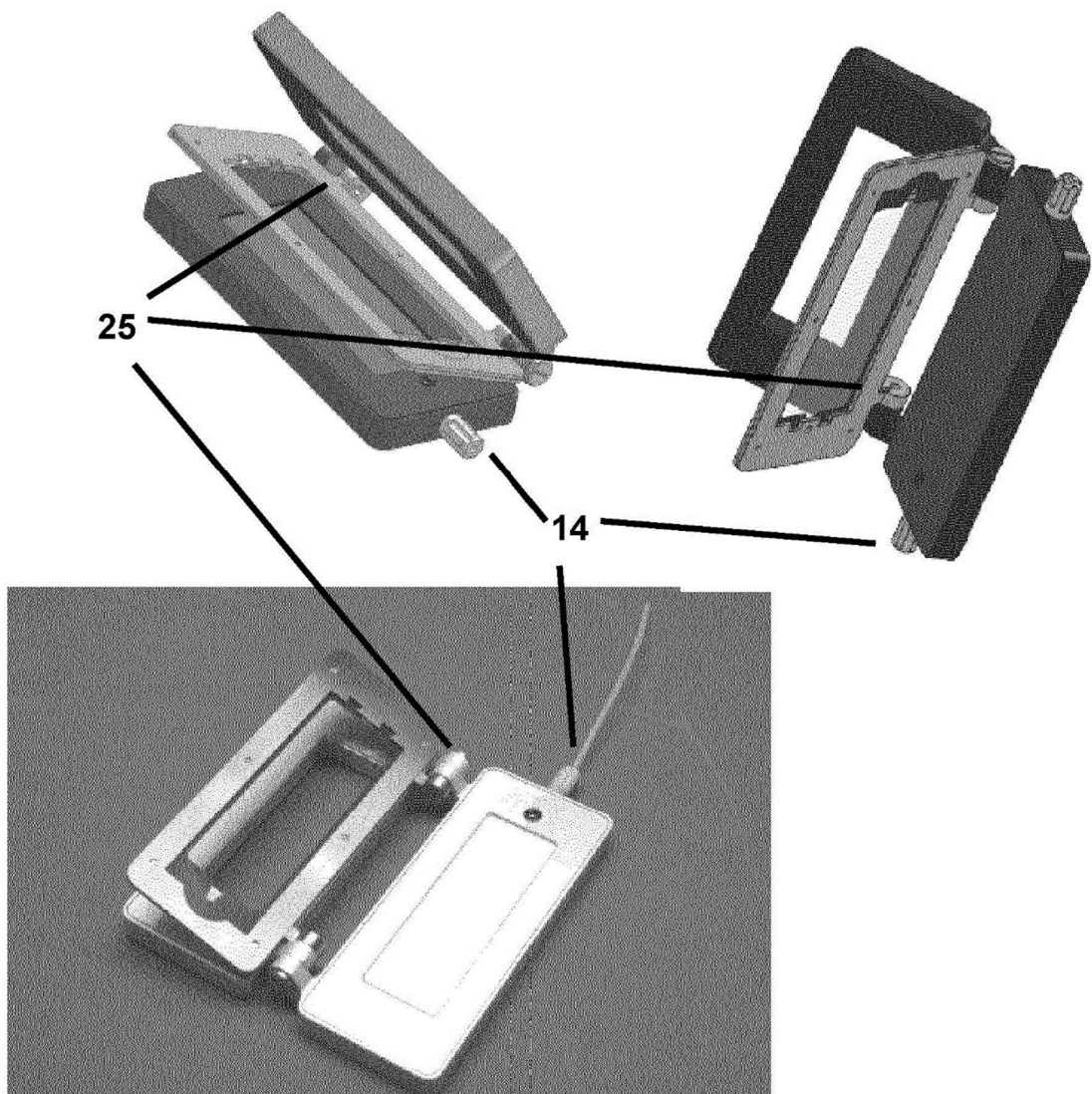


Fig. 11

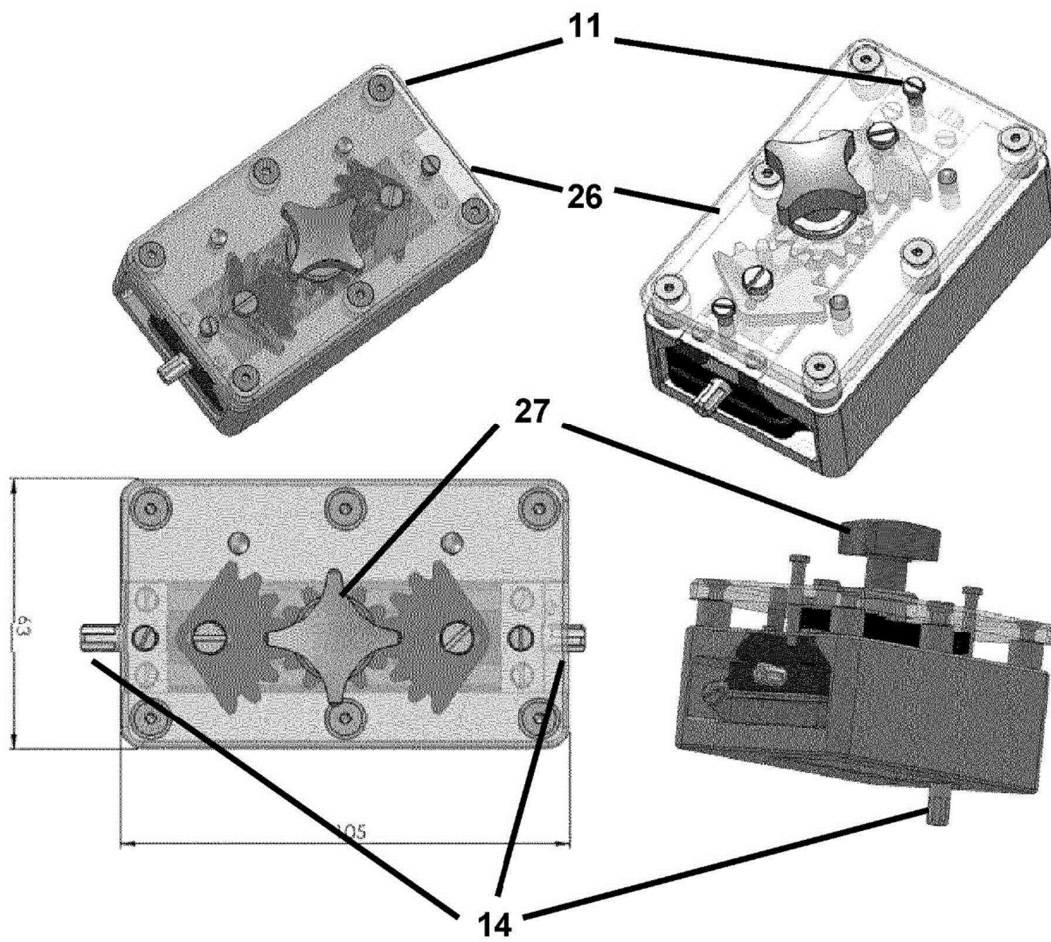


Fig. 12

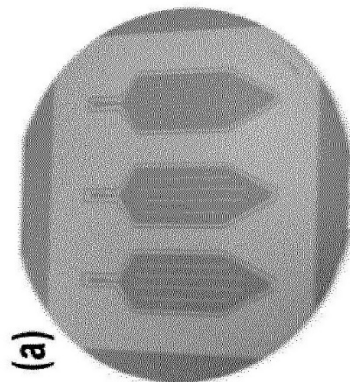
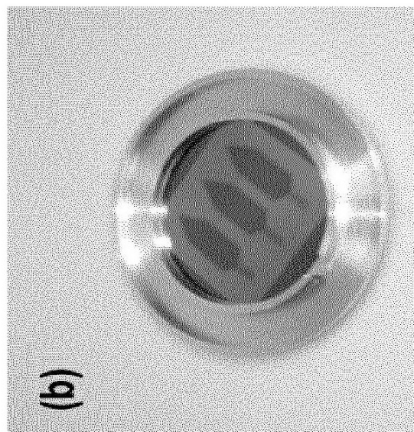
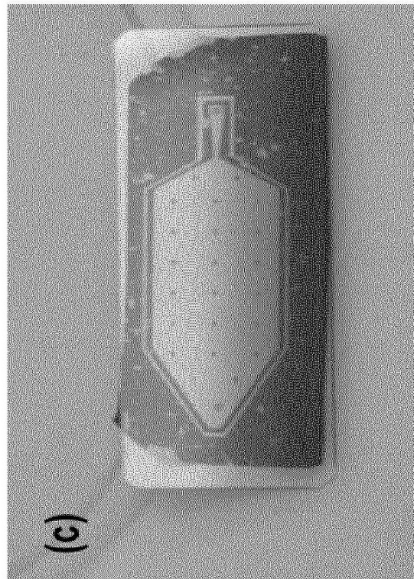


Fig. 13

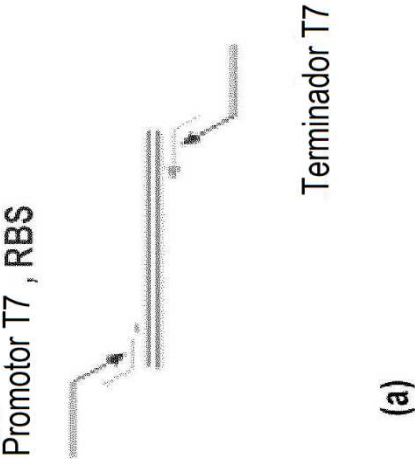
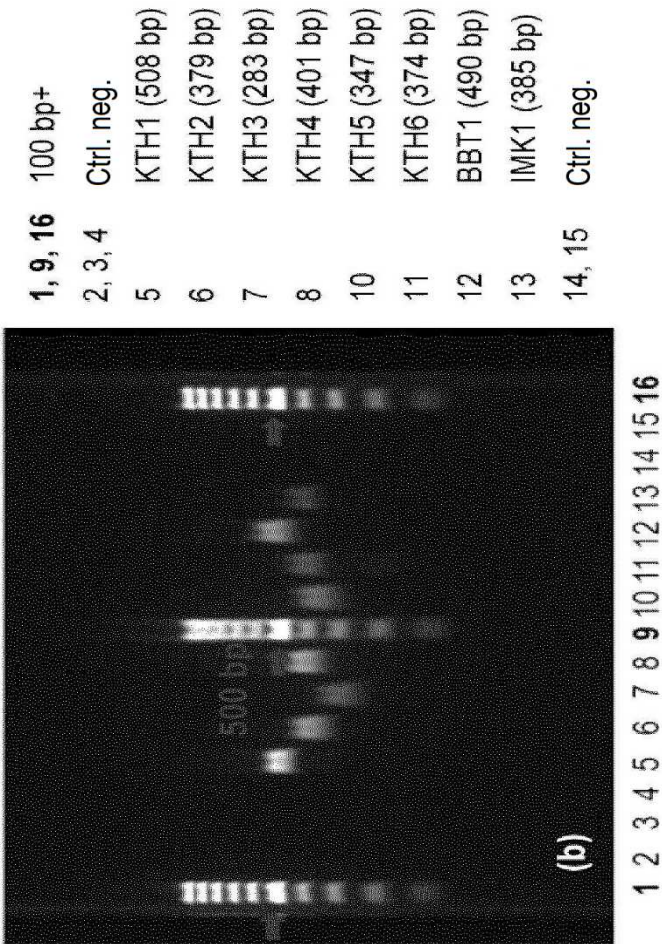


Fig. 14

