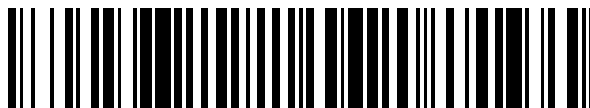


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 432**

21 Número de solicitud: 201700707

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 27/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.08.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.02.2019

71 Solicitantes:

MEDINA VENEGAS, Pedro Manuel (50.0%)

C/ Conde de Barcelona, nº 46

41920 San Juan de Aznalfarache (Sevilla) ES y

CALVO VILLALÓN, Ignacio (50.0%)

72 Inventor/es:

MEDINA VENEGAS, Pedro Manuel y

CALVO VILLALÓN, Ignacio

54 Título: **Método y dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos**

57 Resumen:

Método y dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos.

Constituido a partir de un conjunto de sistemas de recepción y procesamiento de muestras, de captura, concentración y purificación de moléculas diana marcadas por aplicación de un campo magnético, de excitación de las partículas de mareaje para la generación de una señal lumínica y de adquisición y procesamiento digital de la señal registrada para convertirla en una variable cualitativa que indique la presencia o ausencia de la molécula diana en una muestra problema a través de un testigo luminoso, una pantalla, cualquier otro interfaz digital o a través de cualquier otro sistema que permita la visualización de los resultados obtenidos. Del mismo modo, es posible realizar un análisis cuantitativo de la concentración de la molécula diana en la muestra analizada gracias a la comparación de la intensidad de la señal registrada con valores de referencia previamente calibrados.

ES 2 702 432 A1

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo y a un procedimiento a llevar a cabo con el mismo que permiten analizar ácidos nucleicos presentes en todo tipo de muestras.

10 En la actualidad, la electroforesis de ácidos nucleicos es un procedimiento rutinario en clínicas, hospitales y laboratorios de análisis, forenses y de investigación. Esta técnica de separación se lleva a cabo tras la amplificación del material genético y es el método más utilizado para el análisis de ácidos nucleicos. El ensayo se basa en la migración diferencial de dicho material genético a través de un gel polimérico de agarosa o poli(acrilamida) al aplicar un campo eléctrico, lo que da lugar a diferentes bandas según el tamaño de los fragmentos analizados.

15 Este análisis permite la identificación de las secuencias de interés tras la tinción de las bandas generadas, así como la recuperación de los fragmentos deseados para posteriores pruebas y verificaciones, aunque con un rendimiento bastante bajo. En cualquier caso, la electroforesis es una técnica muy versátil y capaz de adaptarse a las necesidades analíticas del usuario, si bien presenta ciertas limitaciones:

- 25 - Las bandas obtenidas tras la separación de los fragmentos pueden ser resultado de la superposición de distintas secuencias, ser bandas inespecíficas del mismo tamaño o presentar un alto grado de difusión, lo que impedirá un correcto reconocimiento.
- En algunos casos, pueden ser necesarias pruebas complementarias como, por ejemplo, el análisis de mapas de restricción, con el consiguiente aumento en costes y tiempo para la obtención de resultados concluyentes.
- 30 - Cada cierto tiempo, el buffer utilizado en la electroforesis pierde su capacidad reguladora de pH y puede alterar la carga de la muestra, comprometiendo el resultado analítico.
- 35 - Es necesario el uso de un marcador de peso molecular para la determinación del tamaño de la banda que se desea analizar. Además, se debe ajustar el tipo de polímero y su concentración en el gel, así como el tiempo de migración, para lograr una correcta identificación de la secuencia objetivo, lo cual puede generar problemas relativos a la imposibilidad de separar ciertas combinaciones de secuencias de tamaño similar o a la despolimerización del gel por altos tiempos de exposición a la corriente.
- 40 - En ciertos tipos de análisis por electroforesis en gel se utiliza poli(acrilamida), que resulta neurotóxica para humanos, mientras que, en el caso de la agarosa, suele emplearse como aclarador de la muestra el bromuro de etidio, una sustancia con potencial cancerígeno. Estos aspectos suelen resultar limitantes en laboratorios con una alta sensibilidad a los agentes nocivos y con limitaciones de espacio, ya que la utilización de bromuro de etidio, por ejemplo, requiere disponer de un área delimitada y específicamente acondicionada para evitar la contaminación de otras zonas del laboratorio.
- 45

50 Asimismo, existe otro procedimiento habitual para el reconocimiento de productos amplificados por PCR u otras técnicas de amplificación, llevado a cabo por laboratorios especializados en este tipo de servicios: la secuenciación. Este proceso analítico abarca un conjunto de técnicas muy variadas que han evolucionado considerablemente en los últimos años, si bien para el

procesamiento de productos de amplificación se sigue recurriendo a técnicas tradicionales como la secuenciación de Sanger. En cualquier caso, la utilización de servicios de secuenciación puede tener ciertos inconvenientes para los usuarios:

- 5 - Existe una limitación temporal que no permite la obtención inmediata de resultados, ya que es necesaria la externalización del servicio a laboratorios especializados que tardan aproximadamente unos 5-7 días en ejecutar los análisis.
- 10 - Se deben realizar una serie de procedimientos y controles previos en la muestra para el correcto procesamiento de la misma sin interferencias por subproductos. Además, se requiere una cantidad mínima de 20ng de ADN por cada 100 bases de longitud de la secuencia que se desea analizar, manteniendo siempre una concentración mínima de 10ng/μL. Para estimar estas variables se utilizan comúnmente instrumentos de cuantificación de ácidos nucleicos como el espectrofotómetro NanoDrop™, que presenta una serie de limitaciones significativas: no permite verificar la integridad de la muestra al no ser capaz de distinguir ácidos nucleicos degradados, tiene una baja sensibilidad analítica, ofrece resultados que pueden verse afectados por interferencias debidas a la presencia simultánea de ADN y ARN y, además, su precio de venta es muy elevado.
- 15 - Generalmente, se debe indicar la longitud de la secuencia que se desea analizar y, en el caso del uso necesario de cebadores específicos para la secuenciación, estos han de ser proporcionados por el cliente en unas condiciones específicas de concentración y solvente.
- 20
- 25

Debido a las necesidades y exigencias anteriormente mencionadas, la secuenciación fallida de fragmentos de interés es bastante común, lo que afecta a la continuidad del trabajo diario en los laboratorios y les ocasiona costes añadidos que deben asumir.

30 Por otra parte, las principales ventajas de la invención propuesta son las siguientes:

- 35 - El dispositivo propuesto puede utilizarse como cribado previo a la electroforesis de fragmentos amplificados por PCR u otras técnicas de amplificación y, además, puede sustituir a la electroforesis en todo tipo de análisis de ácidos nucleicos.
- 40 - El uso del dispositivo propuesto puede evitar resultados fallidos durante la identificación del fragmento objetivo mediante secuenciación debidos a problemas con los cebadores específicos o la cantidad de ADN, ya que la tecnología desarrollada puede utilizarse como prueba previa a la secuenciación para obtener información que pueda ser empleada posteriormente para la identificación satisfactoria de la secuencia objetivo. Además, es posible utilizar el dispositivo propuesto como alternativa a la secuenciación de ácidos nucleicos gracias a la fiabilidad del análisis específico de secuencia que puede efectuarse con el mismo.
- 45 - La invención propuesta permite llevar a cabo el análisis directo de la molécula diana con sensores lo suficientemente potentes, sin necesidad de pretratamiento alguno de las muestras como, por ejemplo, la purificación o amplificación de la molécula diana.
- 50 - No hay compuestos potencialmente cancerígenos implicados en el uso del dispositivo propuesto, a diferencia de ciertas sustancias empleadas en la electroforesis, como el bromuro de etidio o la acrilamida.

- El tiempo de análisis se ve reducido drásticamente, pasando de hasta varias horas en el caso de la electroforesis y la amplificación previa a pocos minutos con el dispositivo propuesto.
- 5 - Los costes de análisis son menores con la utilización del dispositivo propuesto, ya que la electroforesis emplea multitud de elementos no reutilizables, de vida útil reducida o de alto precio. Así pues, el dispositivo propuesto reduce drásticamente los costes asociados a una prueba de PCR con electroforesis y posterior secuenciación simplemente al evitar la lectura mediante electroforesis, aunque, si a esta reducción de
10 costes se le añade la correspondiente al evitar la secuenciación y/o la amplificación previa de la molécula diana, el ahorro económico es notablemente sustancioso.
- En el análisis de ácidos nucleicos específico de secuencia, el dispositivo propuesto resulta más fiable que la electroforesis, ya que se realiza una identificación múltiple por
15 secuencia y no sólo por tamaño. Con esto, se supera la principal limitación de la electroforesis y se puede llevar a cabo un análisis previo a la secuenciación mucho más fiable y preciso, siendo posible, incluso, prescindir de esta prueba de confirmación.
- La vida útil del dispositivo propuesto es equivalente a la de los equipos de electroforesis
20 y secuenciación, mientras que los elementos fungibles tienen un número establecido de pruebas realizables y no hay que estimar o comprobar su viabilidad, como ocurre con ciertos componentes del análisis por electroforesis o secuenciación.
- La lectura de los resultados obtenidos tras la secuenciación requiere de programas
25 específicos que pueden llegar a resultar difíciles de utilizar para el personal no especializado. Sin embargo, con el dispositivo desarrollado se obtiene un resultado sencillo y fácilmente interpretable por todo tipo de personal técnico.
- El dispositivo propuesto permite reducir las necesidades de personal altamente
30 cualificado, un ahorro debido a la sencillez del tratamiento de las muestras, ya que se trata de un procedimiento más rápido y simple que contribuye a eliminar, a su vez, el riesgo de perder las muestras al cargar los canales de los geles de electroforesis, los fallos producidos durante el transporte de dichas muestras para su secuenciación o los errores ocurridos durante este proceso.
- 35 - El dispositivo propuesto representa una alternativa asequible para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o de origen genético, abaratando los costes al cliente final sin que ello suponga una reducción de prestaciones para los usuarios del sistema.
- 40 - La invención propuesta permite llevar a cabo un análisis completo sin necesidad de tecnología accesoria o complementaria, por lo que, al no requerir ningún tipo de equipamiento adicional, hace posible la realización de análisis in situ o en campo y no sólo en instalaciones especializadas, reduciéndose tanto el tiempo necesario para la obtención de resultados como los costes derivados del transporte y almacenamiento de
45 las muestras.
- El dispositivo propuesto permite la automatización del proceso analítico, con lo que se incrementa notablemente el número de muestras analizables por unidad de tiempo y, por tanto, se optimiza el trabajo de laboratorio y se reducen los costes por prueba.
- 50 - El dispositivo propuesto permite realizar tanto análisis cualitativos que indiquen la presencia o ausencia de la molécula diana en muestras problema como el análisis cuantitativo de dicha molécula diana a fin de determinar su concentración en muestras

problema a través del procesamiento digital de la señal registrada y su comparación con valores de referencia previamente calibrados.

- 5 - Empleando el dispositivo y el método de análisis propuestos, se pueden analizar no sólo ácidos nucleicos, sino también otro tipo de macromoléculas biológicas —especialmente proteínas—, para lo cual es necesario únicamente adaptar las sondas con las que se funcionalizan las partículas de captura y marcaje de la molécula diana.
- 10 - En el caso del análisis de proteínas, la invención propuesta también permite reducir notablemente los costes y el tiempo de análisis correspondiente al uso de técnicas estándar como la electroforesis de proteínas o el western blot.
- 15 - La aplicación industrial de esta invención se enmarca dentro de los procedimientos de análisis empleados, entre otros, en los sectores biotecnológico y sanitario, así como en la investigación en ciencias biológicas.

Antecedentes de la invención

20 Aunque no se ha encontrado ninguna invención idéntica a la descrita, se exponen a continuación los documentos encontrados que reflejan el estado de la técnica relacionado con la misma.

25 Así, el documento ES2607753T3 hace referencia a un procedimiento para diagnosticar la susceptibilidad de un individuo que padece de una enfermedad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, el procedimiento comprendiendo evaluar el nivel de expresión o actividad de un gen o sus productos de expresión, o la secuencia de un gen, en una muestra de tejido de un paciente y comparar dicho nivel de expresión o actividad o secuencia con una referencia, en donde el nivel de expresión o actividad o secuencia que es diferente a dicha referencia es indicativo de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC en relación con el estado de referencia, y en donde dicho gen es Myd88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88). En cualquier caso, la invención citada no describe un procedimiento ni un dispositivo similares a los propuestos para el marcaje de la molécula diana y la obtención de resultados analíticos.

35 EP0447154A3 describe un dispositivo para realizar un ensayo heterogéneo, constando de: un miembro poroso comprendiendo una pluralidad de poros para atrapar físicamente, en dicho miembro poroso, al menos un ligando diana de una muestra de fluido, estando dicho miembro poroso adaptado para recibir un reactivo marcado para detectar la presencia o cantidad de, al menos, dicho ligando diana; y un miembro no absorbente teniendo una superficie texturizada, estando dicho miembro no absorbente en comunicación líquida con dicho miembro poroso, dicho miembro no absorbente estando directamente en contacto y formando una red de canales capilares con dicho miembro poroso, en donde dicha comunicación líquida en dichos canales capilares es desde dicho miembro poroso hacia dicho miembro no absorbente. En cualquier caso, la mencionada invención no comparte ni el procedimiento ni el dispositivo que describe la invención propuesta para el análisis de ácidos nucleicos.

50 W02012013731A1 hace referencia a un método para detectar y cuantificar simultáneamente un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica, comprendiendo dicho método: a) aislar y purificar dicho ácido nucleico microbiano, b) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un primer y un segundo ácido nucleico control en diferentes concentraciones en la que el primer ácido nucleico control es un ácido nucleico patrón cuantitativo presente en una concentración de 20 a 5.000 veces el límite de detección de dicho ácido nucleico microbiano, y el segundo ácido nucleico control es un ácido nucleico control interno cualitativo presente en una concentración de 1 a 10 veces el límite de detección de dicho ácido nucleico microbiano,

uno o más pares de cebadores que hibridan específicamente con distintas porciones de secuencia de dicho ácido nucleico microbiano y con distintas porciones de secuencia de dichos ácidos nucleicos control, y sondas que hibridan específicamente con cada una de las secuencias amplificadas por dichos uno o más pares de cebadores, en los que dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control hibridan con diferentes sondas que llevan diferentes marcadores, c) añadir el ácido nucleico microbiano aislado y purificado a dicha mezcla de reacción, d) realizar una o más etapas de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación, comprendiendo dicha etapa de amplificación la producción de uno o más productos de amplificación derivados de dicho ácido nucleico microbiano si está presente en dicha muestra y la producción de un producto de amplificación derivado de dicho primer ácido nucleico control y dicho segundo ácido nucleico control, y en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de hibridación, comprendiendo dicha etapa de hibridación la hibridación de las secuencias amplificadas por dicho par cebador con dichas sondas, en donde las sondas están marcadas con un resto fluorescente donante y un correspondiente resto fluorescente aceptor y cada una de las sondas lleva un diferente tinte fluorescente, e) detectar y medir señales fluorescentes generadas por los productos de amplificación de dicho primer ácido nucleico control y dicho ácido nucleico microbiano y que son proporcionales a su concentración, y detectar simultáneamente señales fluorescentes generadas por dicho producto de amplificación de dicho segundo ácido nucleico control, en donde la presencia de un producto de amplificación de dicho segundo ácido nucleico control es indicativo de una amplificación que se da en la mezcla de reacción incluso en ausencia de un producto de amplificación para dicho ácido nucleico microbiano, y determinar la cantidad de dicho ácido nucleico microbiano en dicha muestra biológica en comparación con las señales generadas por dicho ácido nucleico microbiano y dicho primer ácido nucleico control. En cualquier caso, el método descrito dista del formulado en la invención propuesta para el análisis de ácidos nucleicos y no se hace referencia a un dispositivo de análisis similar al planteado en la presente invención.

ES2603380A1 describe un equipo y procedimiento de detección de protozoos que integra en un único conjunto un dispositivo de muestreo y un kit de detección de protozoos, alojados preferentemente en una caja envolvente portátil, admitiendo el dispositivo de muestreo dos variantes, una de ellas, más completa, para toma de muestras durante un tiempo más largo, del orden de días o semanas, mientras que la otra, más sencilla, está indicada para la toma de muestras en poco tiempo, del orden de horas como mucho. El kit de detección de protozoos incluye unas de tiras reactivas junto con los equipos portátiles y reactivos para poder realizar in situ los procesos de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico), amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), e hibridación/revelado. Estas tiras reactivas presentan el resultado del análisis mediante unos marcajes específicos de los productos amplificados. En cualquier caso, el método planteado difiere del descrito en la invención principal y, además, no se menciona un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

CN 2010 101935704 B muestra un sistema de detección de ácidos nucleicos basado en dos dobles hibridaciones llevadas a cabo en dos fases: en la primera se emplean microesferas magnéticas y nanopartículas de oro funcionalizadas con una sonda de secuencia específica que sólo será retenida al aplicar un campo magnético en presencia del ADN objetivo y, posteriormente, se marca dicha secuencia (código de barras) con quantum dots funcionalizados. En cualquier caso, no se mencionan las características de un procedimiento o un dispositivo de análisis similares a los propuestos en la presente invención, sino las de una cámara de reacción donde se amplifican y detectan ácidos nucleicos.

EP 2011 2270202 A1 presenta un kit de detección de Mycobacterium basado en un sistema de doble hibridación de la molécula diana con una sonda de captura unida a una microesfera magnética (mediante enlace estreptavidina-biotina) y una sonda de marcaje unida a un

quantum dot. Se proporcionan tablas con las secuencias específicas empleadas y se exige un mínimo de homología del 90%. En cualquier caso, la invención citada no hace mención a un dispositivo de análisis similar al propuesto, sino sólo a los reactivos incluidos en el kit de detección.

5 EP 2012 1502101 B1 describe un método de detección de células y virus en todo tipo de muestras —pretratadas o no— empleando sondas de marcaje consistentes tanto en oligonucleótidos como en anticuerpos conjugados con cualquier molécula señalizadora, incluyendo quantum dots. Paralelamente, se aíslan las células marcadas por centrifugación o
10 aplicación de un campo magnético tras ser capturadas, entre otros métodos propuestos. Sin embargo, la invención citada no hace mención a un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

15 EP 2012 1747295 B1 presenta un método de detección general de analitos consistente en su captura con sondas específicas —proteicas o nucleotídicas— conjugadas con microesferas magnéticas y en su marcaje con nanopartículas funcionalizadas con sondas de unión a la molécula objetivo y secuencias de ADN barcode marcadas con estructuras señalizadoras. Tras la doble hibridación, los códigos de barras de ADN son liberados de la estructura por
20 tratamiento térmico o químico y finalmente analizados a través del grupo señalizador para determinar la presencia o ausencia de la molécula objetivo. En cualquier caso, no se describe un dispositivo similar a la invención propuesta para el procesamiento o análisis de la señal generada ni se detallan las características que debe tener el equipo necesario para efectuar el ensayo.

25 EP 2014 2616557 B1 propone un sistema de detección de ácidos nucleicos de doble hibridación con captura y marcaje de la molécula diana en el que interviene una nucleasa capturada por una de las sondas unidas a dicha molécula diana. En este caso, el resultado positivo se obtiene por reducción de la actividad nucleasa en la mezcla de reacción con respecto al control negativo sin molécula diana, o bien, por generación de actividad nucleasa
30 tras la liberación de las enzimas retenidas en presencia de la molécula objetivo. En cualquier caso, se patenta un kit de detección con los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo, pero no se menciona un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta.

35 US 2002 0028457 A1 se basa en un método de detección que comprende el marcaje de la molécula diana con sondas complementarias funcionalizadas con quantum dots, amplificándose opcionalmente dicha molécula diana para acoplarle ciertos grupos químicos —por ejemplo, biotina— que permitan su inmovilización en un soporte sólido. Sin embargo, no se hace referencia a un dispositivo de análisis integrado similar a la invención propuesta ni se
40 plantea el uso de partículas de captura magnética.

US 2007 0259359 A1 consiste en un método de detección de secuencias genéticas capturadas en un soporte sólido basado en el marcaje de la molécula diana con sondas funcionalizadas con grupos señalizadores, de forma que la conformación de la sonda sólo hace posible su degradación y la liberación del grupo señalizador una vez que está unida a la molécula diana.
45 La detección se llevaría a cabo empleando estructuras constituidas por electrodos acoplados a un sustrato en el que se disponen sondas complementarias a los reporteros liberados por acción de una nucleasa, con lo que se genera una señal debida a las variaciones de potencial eléctrico registradas. Además, se presentan métodos de amplificación de la señal y estructuras tipo array para llevar a cabo el ensayo, pero no hay referencias a sistemas de captura
50 magnética ni a un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

US 2007 0269852 A1 plantea un dispositivo de detección de patógenos aéreos mediante un sistema de marcaje con biocomplejos con quantum dots. Dicho dispositivo permite la inyección, filtración y centrifugación de la muestra, así como la obtención de una señal fluorescente,

aunque no se emplean sistemas de captura magnética, ni se describe el sistema de generación y detección de dicha señal fluorescente ni el dispositivo mencionado tiene las características de la invención propuesta.

5 US 2009 0156428 A1 describe un método de detección basado en una estructura tipo array con sondas moleculares de todo tipo dispuestas en cualquier conformación. Se mencionan distintas técnicas de marcaje de las sondas complementarias a la molécula diana y posibles conformaciones del dispositivo de ensayo que pudiera incorporar esta estructura de análisis, pero no se detallan sus características ni se mencionan sistemas de captura magnética de la molécula diana.

10 US 2010 0086993 A1 consiste en un sistema de detección de células basado en su captura con ligandos de unión a receptores conjugados con microesferas magnéticas y su marcaje con ligandos de unión a receptores conjugados con quantum dots. También se hace mención a los instrumentos que cabría emplear para la detección de la señal fluorescente generada y se definen exhaustivamente las características de los reactivos empleados (composición de los quantum dots, pH de reacción...), pero no se describe un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

15 US 2010 7799554 B2 propone un test para la detección de ácidos nucleicos basado en el uso de un dispositivo de flujo lateral que cuenta con una zona de reacción y una zona de visualización. Además, existen sondas de marcaje con un grupo señalizador que sólo se activa en presencia del analito a detectar y sondas de captura que retienen al analito en la zona de visualización. Sin embargo, no se menciona un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta ni se describen los detalles de su funcionamiento.

20 US 2011 0152111 A1 plantea un kit de detección simultánea de múltiples secuencias objetivo basado en un sistema de amplificación selectiva de las moléculas diana presentes en muestras de distinto tipo. En este caso, existen sondas de marcaje funcionalizadas con diferentes cromóforos, pero no se plantea un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta ni se mencionan sistemas de captura y concentración de las moléculas diana.

25 US 2011 0160090 A1 consiste en un microarray de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos monocatenarios que cuenta con una membrana microporosa a través de la cual se desplaza una muestra fluida por capilaridad. Además, existe una zona de marcaje donde se une a la molécula diana una sonda complementaria funcionalizada con quantum dots y una zona de captura con sondas inmovilizadas. Sin embargo, no se emplean partículas de captura magnética a lo largo del proceso ni se menciona un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

30 US 2011 0171749 A1 presenta un sistema de detección de ácidos nucleicos consistente en el uso de nanopartículas de marcaje funcionalizadas con sondas específicas para cada molécula diana (ADN patogénico monocatenario) y partículas magnéticas funcionalizadas con sondas de captura. En este caso se detallan las secuencias de las diferentes sondas y el tamaño y las características de las nanopartículas empleadas. Además, se mencionan diferentes sistemas de procesamiento de la señal generada, que se basan en la medición de la concentración de las partículas de marcaje a través de electrodos una vez lavado el exceso de nanopartículas libres. Sin embargo, no se emplean sistemas de generación y detección de señales lumínicas ni se detallan las características de un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta.

35
40
45
50 US 2011 7955802 B2 describe un método de amplificación y detección de ácidos nucleicos que emplea cebadores funcionalizados con agentes de marcaje y sondas de captura unidas a esferas magnéticas atraídas por un electroimán adyacente a la cámara de reacción. De esta manera, se generan amplicones funcionalizados con dicho agente de marcaje que son

5 concentrados por acción de un campo magnético. Sin embargo, no se describen las características del sistema de excitación del agente de marcaje ni las del sistema de detección y procesamiento de la señal generada. Además, no se lleva a cabo el proceso de detección sin el paso previo de amplificación ni se menciona un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

10 US 2012 0071330 A1 propone un método de detección de ácidos nucleicos basado en una doble hibridación con captura y marcaje de la molécula diana, de forma que las sondas de captura se encuentran inmovilizadas en un soporte sólido. Además, se plantea el uso de sondas anidadas para la amplificación de la señal generada y se describe una serie de procedimientos que permiten maximizar la proporción de moléculas diana. Sin embargo, no se mencionan mecanismos de concentración de dichas moléculas diana mediante la aplicación de campos magnéticos, ni se detallan los mecanismos de detección de la señal generada por los grupos señalizadores de las sondas de marcaje ni se menciona un dispositivo de análisis integrado similar a la invención propuesta.

20 US 2012 8298765 B2 propone un sistema de detección de ácidos nucleicos basado en la hibridación de la molécula diana con monómeros nucleotídicos capaces de polimerizar entre sí al unirse a dicha molécula diana. En este caso, los monómeros están marcados con quantum dots que emiten fluorescencia y se detallan algunas características de la fuente excitadora responsable de la polimerización y la generación de la señal fluorescente, pero no se mencionan mecanismos de captura de las moléculas diana basados en aplicación de campos magnéticos ni se menciona un dispositivo con las características de la invención propuesta.

25 US 2013 0023433 A1 plantea un sistema de identificación de ácidos nucleicos a partir de hibridaciones complejas que implican su captura y marcaje. Además, se menciona la posibilidad de incorporar amplificadores moleculares al sistema y detectar mutaciones de tipo SNP, pero no se describe la naturaleza de las sondas de captura y marcaje empleadas ni se menciona un dispositivo con las características de la invención propuesta.

30 US 2013 0085078 A1 consiste en un sistema de detección de ácidos nucleicos a través del marcaje con sondas inmovilizadas en un soporte sólido dotadas de un grupo señalizador y la hibridación con un cebador que permite que una polimerasa con actividad exonucleasa libere el grupo señalizador de la sonda unida a la molécula diana. En este caso, el resultado positivo se puede deber a un aumento o una disminución de la señal por comparación con la señal inicial o con sondas de referencia sin hibridar. Además, se menciona la posibilidad de amplificar la molécula diana antes de detectar la señal generada, pero no se detallan las características del sistema de generación, procesamiento y detección de la señal, ni se mencionan mecanismos de captura mediante aplicación de campos magnéticos ni se describe un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta.

45 US 2013 0123145 A1 propone un kit de ensayo, aplicable a diversas técnicas analíticas, basado en quantum dots de diferentes características unidos a sondas específicas de distinta naturaleza y dirigidas contra marcadores celulares específicos. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis capaz de generar y procesar una señal detectable con las características de la invención propuesta ni se mencionan mecanismos de captura basados en la aplicación de campos magnéticos.

50 US 2013 0172211 A1 consiste en un método para detectar secuencias genéticas de interés basado en la generación y posterior amplificación y secuenciación de un producto de ligación resultante de la unión de los distintos fragmentos complementarios a la molécula diana, hibridados de forma consecutiva y secuencial en presencia de la misma. Además, se menciona que el proceso de amplificación y detección puede implicar el marcaje con fluoróforos, pero no

se detallan mecanismos de captura de la molécula diana ni las características de un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta.

5 US 2013 8609337 B2 consiste en un método de preparación de partículas señalizadoras donde una microesfera de hidrogel es funcionalizada con un conjunto de sondas de anclaje y señalización que permiten la identificación y detección de moléculas específicas. En este caso, se propone un sistema de marcaje basado en quantum dots, pero no se mencionan mecanismos de captura molecular ni las características de un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta.

10 US 2014 0024024 A1 plantea un sistema de detección capaz de identificar secuencialmente ARN, proteínas y ADN en muestras de células y tejidos, así como de obtener imágenes de cada uno de los resultados analíticos generados a lo largo del proceso. En este caso, se contempla un proceso de amplificación de la señal previo a la detección de la misma, de forma que la intensidad de dicha señal se correlaciona positivamente con la concentración de la molécula diana presente en la muestra. Además, se menciona la posible naturaleza fluorescente de la señal, pero no se detallan mecanismos de captura molecular ni se describe un dispositivo de análisis capaz de generar y detectar la señal con las características de la invención propuesta.

20 US 2014 0332407 A1 consiste en un kit de detección basado en un sensor constituido por un par de electrodos entre los cuales se dispone una estructura capaz de inmovilizar una serie de moléculas receptoras que retienen moléculas diana de diversa naturaleza a su paso. Posteriormente, dichas moléculas diana son marcadas con moléculas señalizadoras con propiedades conductoras o capaces de depositar iones metálicos en la zona situada entre los electrodos. En cualquier caso, aunque se menciona que la naturaleza de la señal detectada puede ser tanto óptica como eléctrica, no se detallan mecanismos de captura molecular basados en la aplicación de campos magnéticos ni se describe un dispositivo de análisis capaz de generar y detectar la señal con las características de la invención propuesta.

30 US 2014 8691500 B2 plantea un sistema de cámaras donde realizar el procesamiento y posterior análisis de muestras biológicas para la detección de analitos específicos. En este caso, la molécula diana es capturada con una partícula magnética y marcada con una etiqueta —cualquiera sea su origen— que permitiría su posterior detección. Sin embargo, no se menciona un módulo de generación y detección de señal en el sistema ni se describe un dispositivo de análisis integrado con las características de la invención propuesta.

40 US 2015 0004598 A1 propone diferentes métodos para identificar o cuantificar analitos en diversas muestras usando un ácido nucleico como enlace entre el analito a identificar y la partícula de marcaje, ya sea un fluoróforo, una esfera magnética, un quantum dot, un anticuerpo, etc. Sin embargo, no se menciona un dispositivo similar a la invención propuesta, ya que la patente citada tiene como objetivo la integración del método en técnicas como la inmunohistoquímica, el western blot, la hibridación in situ, etc.

45 US 2016 0231324 A1 propone un instrumento de detección de marcadores moleculares mediante un sistema de microfluidos donde la muestra se encuentra embebida en microgotas y donde se emplea un sistema de marcaje basado en anticuerpos, enzimas, aptámeros y sensores de fluorescencia. En cualquier caso, se trata de un aparato de detección similar a un citómetro de flujo, que carece de sistemas para el procesamiento de las muestras y que no presenta las características de la invención propuesta.

50 US 2016 0265036 A1 propone un método de identificación y cuantificación de ácidos nucleicos específicos en muestras biológicas mediante hibridación doble con cadenas complementarias: una de ellas fijada a una superficie y la otra, a un grupo fosfato que, unido a una enzima

catalítica, genera un producto de reacción detectable. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis integrado y funcional similar a la invención propuesta.

5 US 2016 0298179 A1 plantea un microchip para detectar moléculas diana mediante la unión de grupos señalizadores con luminóforos. Se trata de una estructura similar a un microarray, aunque emplea un sistema diferente para el marcaje de la molécula diana. De hecho, se pretende utilizar el instrumental del análisis con microarrays para llevar a cabo el ensayo descrito y, por tanto, no se menciona dispositivo alguno a patentar como ocurre en el caso de la invención propuesta.

10 US 2016 9274077 B2 tiene por objeto un sistema de detección de interacciones y uniones entre moléculas aplicable, además, a la secuenciación de polinucleótidos. Dicho sistema se basa en el uso de electrodos y/o de una fuerza electromagnética, pero no comparte las características del dispositivo de análisis integrado objeto de invención.

15 US 2016 9482662 B2 describe un método de detección de biomoléculas que implica el marcaje de las mismas con diferentes sondas y la utilización de un sistema de pocillos adaptado para la visualización de dichas biomoléculas al microscopio, ya sea empleando luz blanca o generando fluorescencia. Sin embargo, no se menciona un dispositivo de análisis integrado y funcional similar a la invención propuesta ni se hace referencia al procesamiento de las muestras analizadas.

20 US 2017 9536041 B2 plantea un método de secuenciación de moléculas simples de ADN basado en una señal fluorescente, química, eléctrica o electromagnética y en un sistema multicanal que permite, además, detectar el patrón epigenético. Sin embargo, no se describe un dispositivo para la generación y adquisición de la señal o para el procesamiento de las muestras con las características de la invención propuesta.

25 WO 1998 033939 A1 presenta un sistema de secuenciación de moléculas simples de ADN que emplea microesferas magnéticas para fijar las moléculas diana a un soporte. Posteriormente, una vez capturadas dichas moléculas diana, se produce la incorporación, por acción de una polimerasa, de nucleótidos modificados identificables gracias a la reflexión de la radiación ultravioleta que se hace incidir sobre la muestra. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta para llevar a cabo este procedimiento.

30 WO 2003 025540 A2 describe un método de análisis de ácidos nucleicos que emplea hasta tres etiquetas moleculares, ya sean moléculas luminiscentes o fluorescentes, enzimas, radioisótopos, biotinas, avidinas, semiconductores, oro coloidal, quantum dots, anticuerpos, aptanos, lípidos, etc. Con ello, se consigue amplificar la señal para aumentar la resolución del análisis y lograr una identificación más precisa de la molécula diana, pero en la patente citada no se describe un dispositivo de análisis integrado y funcional similar a la invención propuesta.

35 WO 2005 107818 A2 propone un método para realizar imaging in vivo empleando quantum dots conjugados con etiquetas moleculares, ya sean ácidos nucleicos, anticuerpos, antígenos o lípidos, en muestras vivas como tejidos o células de distinto tipo. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta para llevar a cabo el ensayo.

40 WO 2009 012343 A2 propone un array para detectar una molécula diana en una muestra; en concreto, un sistema de lectura que permite efectuar el análisis en un ambiente microfluído empleando un mecanismo de inyección. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis con las características de la invención propuesta para llevar a cabo el ensayo.

- 5 WO 2010 057264 A1 plantea un método de detección rápida de analitos —ya sean ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, anticuerpos, virus, bacterias o células— en muestras acuosas empleando fluoróforos o quantum dots. En ciertos tipos de análisis, el sistema citado requiere un proceso de digestión del ADN de cadena doble para poder detectar la señal generada posteriormente. En cualquier caso, tras la unión de las etiquetas al analito, se procedería a analizar el espectro de la señal registrada, pero no se describe un dispositivo para la generación y detección de la señal o para el procesamiento de las muestras con las características de la invención propuesta.
- 10 WO 2011 038403 A1 se refiere a un método de detección molecular basado en procesos de hibridación en distintas condiciones, pero no se describe un dispositivo integrado similar a la invención propuesta, ni un sistema generador ni detector de señal, ni la naturaleza de la señal generada ni los mecanismos moleculares de captura de la molécula diana.
- 15 WO 2012 016357 A1 se refiere a un array que permite analizar la interacción entre distintas moléculas, ya sean polipéptidos, anticuerpos, carbohidratos, etc. Para ello, se conjuga a la primera molécula problema una partícula de marcaje —una microesfera magnética, un fluorocromo o un quantum dot— y se fija la segunda molécula problema a un sustrato de diferente origen. Así pues, si se produce la interacción entre las dos moléculas, se generará una señal detectable al aplicar un campo magnético, un campo eléctrico o una radiación electromagnética, pero no se describe un dispositivo integrado similar a la invención propuesta que permita llevar a cabo este análisis.
- 20
- 25 WO 2016 005517 A1 describe un método de detección de Leishmaniosis mediante amplificación y marcaje de la molécula diana con oro coloidal. En este caso, se lleva a cabo un marcaje directo de los amplicones de la molécula diana en lugar de mediado por sondas, pero no se menciona un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta para llevar a cabo el ensayo.
- 30 WO 2016 065192 A1 plantea un método de detección de ácidos nucleicos basado en la liberación de un marcador tras la digestión de ADN de doble cadena por la acción de nucleasas sobre una muestra inmovilizada y marcada. Sin embargo, no se describe un dispositivo de análisis similar a la invención propuesta para llevar a cabo el ensayo.
- 35 WO 2017 008177 A1 propone un microarray que detecta mutaciones en genes específicos mediante un procedimiento que implica el uso de partículas de marcaje magnéticas, quantum dot, proteínas fluorescentes, tintes moleculares, etc. Sin embargo, no se menciona un dispositivo de análisis integrado y funcional similar a la invención propuesta.
- 40 Conclusión: Como se desprende de la investigación realizada, ninguno de los documentos encontrados soluciona los problemas planteados como lo hace la invención propuesta.

Descripción de la invención

- 45 El dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos objeto de la presente invención se constituye a partir de una estructura integrada que cuenta con los siguientes módulos:
- 50
- Sistema de recepción de muestras que comprende un conjunto de estructuras para el acoplamiento de los recipientes que contienen dichas muestras, así como los recipientes en los que se depositan dichas muestras para la realización del análisis.
 - Sistema de procesamiento de muestras dotado de una fuente térmica regulable que permite modular y controlar la temperatura de dichas muestras para que se produzca la

desnaturalización de las moléculas diana y la hibridación de dichas moléculas diana con las sondas de marcaje y las sondas de captura incorporadas a las muestras.

- 5 - Sistema de captura, concentración y purificación de las moléculas diana marcadas por aplicación de un campo magnético. En este caso, existe un sistema capaz de generar, modular y aplicar un campo magnético sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes que contienen las muestras. Este sistema permite capturar, concentrar y purificar las moléculas diana unidas a las sondas de captura y de marcaje y, posteriormente, permite retirar el exceso de sondas de marcaje y retirar las sondas de 10 captura para evitar interferencias durante la adquisición de la señal lumínica. Además, este sistema dispone de un agente desnaturalizante aplicado de forma manual o automática al contenido de los recipientes donde se realiza el procesamiento de las muestras para liberar las sondas de marcaje y las sondas de captura retenidas tras el paso de purificación, lo que permite la retirada de dichas sondas de captura y la 15 posterior generación de la señal lumínica por excitación de las partículas unidas a las sondas de marcaje.
- 20 - Sistema de excitación de las partículas de marcaje para la generación de la señal lumínica. Este módulo se compone de un conjunto de LEDs capaces de emitir radiación ultravioleta o de cualquier otro sistema de iluminación capaz de emitir radiación ultravioleta o capaz de emitir cualquier otro tipo de radiación electromagnética capaz de excitar las partículas de marcaje, haciendo incidir dicha radiación sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes donde se encuentran las sondas de maceaje liberadas tras la captura y purificación de las moléculas diana marcadas. Por otra parte, 25 este sistema cuenta con una serie de materiales y estructuras antirreflectantes y filtros ópticos dispuestos de forma que reducen al máximo la contaminación lumínica y, con ello, la interferencia sobre la señal generada.
- 30 - Sistema de adquisición y procesamiento de la señal lumínica a través de fotosensores, estructuras de amplificación, elementos de procesamiento digital y sistemas para la visualización de resultados. Este módulo está constituido por un conjunto de fotosensores capaces de detectar luz del espectro visible o cualquier otro tipo de señal lumínica y cuya posición y orientación con respecto a las estructuras de acoplamiento con los recipientes en los que se encuentran las sondas de marcaje liberadas permiten 35 registrar de forma óptima la señal generada por la excitación de las partículas de marcaje. Adicionalmente, se acoplan al sistema estructuras de amplificación de la señal registrada —como, por ejemplo, tubos fotomultiplicadores, amplificadores de voltaje o sistemas ópticos— y elementos de procesamiento digital que convierten la señal registrada en una variable cualitativa que indique la presencia o ausencia de la molécula diana en la muestra analizada a través de un testigo luminoso, una pantalla, cualquier otro interfaz digital o a través de cualquier otro sistema que permita la 40 visualización de los resultados obtenidos. Del mismo modo, es posible realizar un análisis cuantitativo de la concentración de la molécula diana en la muestra analizada gracias a la comparación de la intensidad de la señal registrada con valores de referencia previamente calibrados.
- 45 - Sistemas auxiliares:
 - 50 - Estructuras aislantes que impiden que el calor generado por la fuente térmica regulable afecte al funcionamiento de otros componentes del dispositivo y que, por otra parte, mantienen los fotosensores protegidos para garantizar la estabilidad, fiabilidad y robustez de las mediciones efectuadas por dichos fotosensores.

- Sistemas de alimentación, resistencias eléctricas, interruptores y cualquier otro componente eléctrico o electrónico auxiliar del dispositivo.
- Carcasa protectora portátil que alberga el conjunto de módulos y sistemas anteriormente descritos de forma integrada y funcional.

En cuanto al análisis llevado a cabo empleando la invención propuesta, el ensayo se basa en los principios moleculares mostrados en la figura 1, que permiten la captura y marcaje de la molécula diana.

Por otra parte, el procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos que hace uso del dispositivo propuesto se desarrolla en las siguientes etapas:

- i. Tomar, como punto de partida, una muestra problema que pueda contener la molécula diana.
- ii. Traspasar la muestra problema al recipiente inicial y añadir las partículas de marcaje y las partículas de captura magnética funcionalizadas con las correspondientes sondas.
- iii. Acoplar el recipiente inicial en el receptáculo inicial, activar y regular la fuente térmica para que la muestra problema alcance la temperatura de desnaturalización, esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura, regular la fuente térmica para que la muestra problema alcance la temperatura de hibridación y esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura.
- iv. Desactivar la fuente térmica, activar el sistema de captura magnética, esperar unos segundos, retirar el sobrenadante del recipiente inicial, desactivar el sistema de captura magnética, aplicar el agente desnaturalizante al contenido del recipiente inicial, agitar suavemente durante unos segundos, activar el sistema de captura magnética y esperar unos segundos.
- v. Tomar, sin desacoplar el recipiente inicial del receptáculo inicial, el volumen contenido en dicho recipiente inicial, libre de partículas de captura magnética, y traspasarlo al recipiente final.
- vi. Desactivar el sistema de captura magnética, activar el sistema de generación de la señal y acoplar el recipiente final en el receptáculo final para visualizar el resultado obtenido por el sistema de adquisición y procesamiento de la señal generada.

En una realización diferente, se puede emplear un sistema de bombeo de muestras u otros sistemas de inyección de muestras en lugar de que el dispositivo disponga de estructuras habilitadas para la recepción de los recipientes con dichas muestras. En cualquier caso, las muestras analizadas seguirían sufriendo el mismo tratamiento; sólo cambiaría la forma de hacerlas pasar por el dispositivo.

Breve descripción de los dibujos

Para una mejor comprensión de la presente descripción se acompañan unos dibujos que representan una realización preferente de la presente invención:

Figura 1: Esquema de los principios moleculares en que se basa el análisis de ácidos nucleicos llevado a cabo empleando el dispositivo propuesto, con doble hibridación entre la molécula diana (línea horizontal central) y la sonda con la partícula de captura (izquierda) y la sonda con la partícula de marcaje (derecha).

Figura 2: Desarrollo de las etapas que comprende el procedimiento de análisis de ácidos nucleicos llevado a cabo empleando el dispositivo objeto de la presente invención.

Las referencias numéricas que aparecen en dichas figuras corresponden a los siguientes elementos constitutivos de la invención:

1. Dispositivo de análisis
2. Recipiente inicial
3. Partículas de marcaje
4. Partículas de captura magnética
5. Receptáculo inicial
6. Fuente térmica regulable
7. Sistema de captura magnética
8. Agente desnaturizante
9. Recipiente final
10. Receptáculo final
11. Sistema de generación de la señal
12. Sistema de visualización de resultados

Descripción de una realización preferente

Una realización preferente del dispositivo para analizar ácidos nucleicos objeto de la presente invención puede basarse en una estructura integrada que cuenta con los siguientes módulos:

- Sistema de recepción de muestras que comprende un conjunto de estructuras para el acoplamiento de los recipientes que contienen dichas muestras, así como los recipientes en los que se depositan dichas muestras para la realización del análisis.
- Sistema de procesamiento de muestras dotado de una fuente térmica regulable que permite modular y controlar la temperatura de dichas muestras para que se produzca la desnaturización de las moléculas diana y la hibridación de dichas moléculas diana con las sondas de marcaje y las sondas de captura incorporadas a las muestras.
- Sistema de captura, concentración y purificación de las moléculas diana marcadas por aplicación de un campo magnético. En este caso, existe un sistema capaz de generar, modular y aplicar un campo magnético sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes que contienen las muestras. Este sistema permite capturar, concentrar y purificar las moléculas diana unidas a las sondas de captura y de marcaje y, posteriormente, permite retirar el exceso de sondas de marcaje y retirar las sondas de captura para evitar interferencias durante la adquisición de la señal lumínica. Además, este sistema dispone de un agente desnaturizante aplicado de forma manual o automática al contenido de los recipientes donde se realiza el procesamiento de las muestras para liberar las sondas de marcaje y las sondas de captura retenidas tras el

paso de purificación, lo que permite la retirada de dichas sondas de captura y la posterior generación de la señal lumínica por excitación de las partículas unidas a las sondas de marcaje.

- 5
- Sistema de excitación de las partículas de marcaje para la generación de la señal lumínica. Este módulo se compone de un conjunto de LEDs capaces de emitir radiación ultravioleta o de cualquier otro sistema de iluminación capaz de emitir radiación ultravioleta o capaz de emitir cualquier otro tipo de radiación electromagnética capaz de excitar las partículas de marcaje, haciendo incidir dicha radiación sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes donde se encuentran las sondas de marcaje liberadas tras la captura y purificación de las moléculas diana marcadas. Por otra parte, este sistema cuenta con una serie de materiales y estructuras antirreflectantes y filtros ópticos dispuestos de forma que reducen al máximo la contaminación lumínica y, con ello, la interferencia sobre la señal generada.
- 10
- Sistema de adquisición y procesamiento de la señal lumínica a través de fotosensores, estructuras de amplificación, elementos de procesamiento digital y sistemas para la visualización de resultados. Este módulo está constituido por un conjunto de fotosensores capaces de detectar luz del espectro visible o cualquier otro tipo de señal lumínica y cuya posición y orientación con respecto a las estructuras de acoplamiento con los recipientes en los que se encuentran las sondas de marcaje liberadas permiten registrar de forma óptima la señal generada por la excitación de las partículas de marcaje. Adicionalmente, se acoplan al sistema estructuras de amplificación de la señal registrada —como, por ejemplo, tubos fotomultiplicadores, amplificadores de voltaje o sistemas ópticos— y elementos de procesamiento digital que convierten la señal registrada en una variable cualitativa que indique la presencia o ausencia de la molécula diana en la muestra analizada a través de un testigo luminoso, una pantalla, cualquier otro interfaz digital o a través de cualquier otro sistema que permita la visualización de los resultados obtenidos. Del mismo modo, es posible realizar un análisis cuantitativo de la concentración de la molécula diana en la muestra analizada gracias a la comparación de la intensidad de la señal registrada con valores de referencia previamente calibrados.
- 15
- Sistemas auxiliares:
- Estructuras aislantes que impiden que el calor generado por la fuente térmica regulable afecte al funcionamiento de otros componentes del dispositivo y que, por otra parte, mantienen los fotosensores protegidos para garantizar la estabilidad, fiabilidad y robustez de las mediciones efectuadas por dichos fotosensores.
- 20
- Sistemas de alimentación, resistencias eléctricas, interruptores y cualquier otro componente eléctrico o electrónico auxiliar del dispositivo.
- 25
- Carcasa protectora portátil que alberga el conjunto de módulos y sistemas anteriormente descritos de forma integrada y funcional.
- 30

Por otra parte, el procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos empleando el dispositivo propuesto, con alusión a las referencias numéricas, se desarrolla en las siguientes etapas:

- 50
- i. Tomar, como punto de partida, una muestra problema que pueda contener la molécula diana.

- ii. Traspasar la muestra problema al recipiente inicial (2) y añadir las partículas de marcaje (3) y las partículas de captura magnética (4) funcionalizadas con las correspondientes sondas.
- 5 iii. Acoplar el recipiente inicial (2) en el receptáculo inicial (5), activar y regular la fuente térmica (6) para que la muestra problema alcance la temperatura de desnaturalización, esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura, regular la fuente térmica (6) para que la muestra problema alcance la temperatura de hibridación y esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura.
- 10 iv. Desactivar la fuente térmica (6), activar el sistema de captura magnética (7), esperar unos segundos, retirar el sobrenadante del recipiente inicial (2), desactivar el sistema de captura magnética (7), aplicar el agente desnaturalizante (8) al contenido del recipiente inicial (2), agitar suavemente durante unos segundos, activar el sistema de captura magnética (7) y esperar unos segundos.
- 15 v. Tomar, sin desacoplar el recipiente inicial (2) del receptáculo inicial (5), el volumen contenido en dicho recipiente inicial (2), libre de partículas de captura magnética (4), y traspasarlo al recipiente final (9).
- 20 vi. Desactivar el sistema de captura magnética (7), activar el sistema de generación de la señal (11) y acoplar el recipiente final (9) en el receptáculo final (10) para visualizar el resultado obtenido por el sistema de adquisición y procesamiento de la señal generada (12).
- 25

REIVINDICACIONES

1. Método para el análisis de ácidos nucleicos caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 5
- i.- Tomar, como punto de partida, una muestra problema que pueda contener la molécula diana.
- 10
- ii.- Traspasar la muestra problema al recipiente inicial (2) y añadir las partículas de marcaje (3) y las partículas de captura magnética (4) funcionalizadas con las correspondientes sondas.
- 15
- iii.- Acoplar el recipiente inicial (2) en el receptáculo inicial (5), activar y regular la fuente térmica (6) para que la muestra problema alcance la temperatura de desnaturalización, esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura, regular la fuente térmica (6) para que la muestra problema alcance la temperatura de hibridación y esperar unos minutos una vez alcanzada dicha temperatura.
- 20
- iv.- Desactivar la fuente térmica (6), activar el sistema de captura magnética (7), esperar unos segundos, retirar el sobrenadante del recipiente inicial (2), desactivar el sistema de captura magnética (7), aplicar el agente desnaturalizante (8) al contenido del recipiente inicial (2), agitar suavemente durante unos segundos, activar el sistema de captura magnética (7) y esperar unos segundos.
- 25
- v.- Tomar, sin desacoplar el recipiente inicial (2) del receptáculo inicial (5), el volumen contenido en dicho recipiente inicial (2), libre de partículas de captura magnética (4), y traspasarlo al recipiente final (9).
- 30
- vi.- Desactivar el sistema de captura magnética (7), activar el sistema de generación de la señal (11) y acoplar el recipiente final (9) en el receptáculo final (10) para visualizar el resultado obtenido por el sistema de adquisición y procesamiento de la señal generada (12).
2. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicación 1, caracterizado porque, tras retirar el sobrenadante no retenido por acción del sistema de captura magnética, se requiere añadir un cierto volumen de una solución tampón antes de aplicar el agente desnaturalizante.
- 35
3. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la realización del análisis no necesita trasladar el sobrenadante de un recipiente a otro, siendo posible llevar a cabo el ensayo en un único compartimento al encontrarse integrados los diferentes módulos y sistemas que comprende el dispositivo empleado en la realización del análisis, de manera que el procesamiento de la muestra y la generación, adquisición y procesamiento de la señal se llevan a cabo de forma óptima y sin interferencias de ningún tipo.
- 40
4. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque, al analizar muestras que puedan contener ácidos nucleicos, será posible establecer los controles negativos y positivos necesarios para garantizar la fiabilidad, robustez, sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad del ensayo.
- 45
5. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se puede realizar el análisis simultáneo de una pluralidad de muestras empleando un dispositivo que disponga de una pluralidad de sistemas de recepción de muestras con estructuras habilitadas al efecto y comprenda una pluralidad de sistemas de procesamiento de
- 50

muestras y una pluralidad de sistemas de generación, adquisición y procesamiento de la señal o, al menos, comprenda una pluralidad de algunas de las estructuras que los componen.

5 6. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se puede realizar el análisis de todo tipo de muestras problema, hayan sufrido o no cualquier tipo de tratamiento previo como, por ejemplo, la purificación o amplificación de la molécula diana.

10 7. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque permite realizar el análisis de la molécula diana cualesquiera que sean la naturaleza, el tamaño y la secuencia de dicha molécula diana y sea o no conocida la secuencia de dicha molécula diana.

15 8. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque permite realizar el análisis de la molécula diana cualquiera que sea la naturaleza de las sondas, de las partículas de marcaje y de las partículas de captura empleadas en la realización de dicho análisis.

20 9. Método para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se puede aplicar dicho método al análisis de proteínas adaptando únicamente las sondas con las que se funcionalizan las partículas de captura y de marcaje de la molécula diana.

25 10. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos caracterizado porque forma parte de la ejecución del procedimiento descrito en las anteriores reivindicaciones y comprende los siguientes sistemas:

30 - Sistema de recepción de muestras que comprende un conjunto de estructuras para el acoplamiento de los recipientes que contienen dichas muestras, así como los recipientes en los que se depositan dichas muestras para la realización del análisis.

35 - Sistema de procesamiento de muestras dotado de una fuente térmica regulable que permite modular y controlar la temperatura de las muestras para que se produzca la desnaturalización de las moléculas diana y la hibridación de dichas moléculas diana con las sondas de marcaje y las sondas de captura incorporadas a las muestras.

40 - Sistema de captura, concentración y purificación de las moléculas diana marcadas que permite generar, modular y aplicar un campo magnético sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes que contienen las muestras para capturar, concentrar y purificar las moléculas diana unidas a las sondas de captura y de marcaje y para, posteriormente, retirar el exceso de sondas de marcaje y retirar las sondas de captura para evitar interferencias durante la adquisición de la señal lumínica.

45 - Sistema de excitación de las partículas de marcaje para la generación de la señal lumínica que comprende un conjunto de LEDs capaces de emitir radiación ultravioleta o cualquier otro sistema de iluminación capaz de emitir radiación ultravioleta o capaz de emitir cualquier otro tipo de radiación electromagnética capaz de excitar las partículas de marcaje, haciendo incidir dicha radiación sobre las estructuras de acoplamiento con los recipientes donde se encuentran las sondas de marcaje liberadas tras la captura y purificación de las moléculas diana marcadas. Además, este sistema comprende
50 también una serie de materiales y estructuras antirreflectantes y filtros ópticos dispuestos de forma que reducen al máximo la contaminación lumínica y, con ello, la interferencia sobre la señal generada.

- 5 - Sistema de adquisición de la señal lumínica que comprende un conjunto de fotosensores capaces de detectar luz del espectro visible o cualquier otro tipo de señal lumínica y cuya posición y orientación con respecto a las estructuras de acoplamiento con los recipientes en los que se encuentran las sondas de marcaje liberadas permiten registrar de forma óptima la señal generada por la excitación de las partículas de marcaje.
- 10 11. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicación 10, caracterizado porque, adicionalmente, se acoplan al sistema de adquisición de la señal lumínica estructuras de amplificación de la señal registrada —como, por ejemplo, tubos fotomultiplicadores, amplificadores de voltaje o sistemas ópticos— y elementos de procesamiento digital que convierten dicha señal registrada en una variable cualitativa que indique la presencia o ausencia de la molécula diana en la muestra analizada a través de un testigo luminoso, una pantalla, cualquier otro interfaz digital o a través de cualquier otro sistema que permita la visualización de los resultados obtenidos.
- 15 12. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 y 11, caracterizado porque permite realizar un análisis cuantitativo de la concentración de la molécula diana en la muestra analizada gracias al procesamiento digital de la intensidad de la señal registrada y su comparación con valores de referencia previamente calibrados.
- 20 13. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque comprende los siguientes sistemas auxiliares: estructuras aislantes que impiden que el calor generado por la fuente térmica regulable afecte al funcionamiento de otros componentes del dispositivo y que, por otra parte, mantienen los fotosensores protegidos para garantizar la estabilidad, fiabilidad y robustez de las mediciones efectuadas por dichos fotosensores; sistemas de alimentación, resistencias eléctricas, interruptores y cualquier otro componente eléctrico o electrónico auxiliar del dispositivo. Además, dicho dispositivo comprende también una carcasa protectora portátil que alberga el conjunto de módulos y sistemas descritos en anteriores reivindicaciones de forma integrada y funcional.
- 25 14. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque las muestras son proporcionadas mediante un sistema de bombeo o inyección que las hace pasar por el dispositivo para la realización del análisis en lugar de ser traspasadas a recipientes acoplables en estructuras habilitadas al efecto.
- 30 15. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque permite realizar el análisis de la molécula diana de forma directa y sin necesidad de tecnología accesoria o complementaria, lo que permite realizar análisis tanto in situ o en campo como en laboratorios y en cualquier otro tipo de instalaciones acondicionadas y equipadas para la realización de análisis moleculares.
- 35 16. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 a 15, caracterizado porque se puede automatizar el procedimiento analítico llevado a cabo con dicho dispositivo haciendo uso de elementos adicionales de software y hardware.
- 40 17. Dispositivo para el análisis de ácidos nucleicos, según reivindicaciones 10 a 16, caracterizado porque se puede aplicar dicho dispositivo al análisis de proteínas adaptando únicamente las sondas con las que se funcionalizan las partículas de captura y de marcaje de la molécula diana.
- 45
- 50

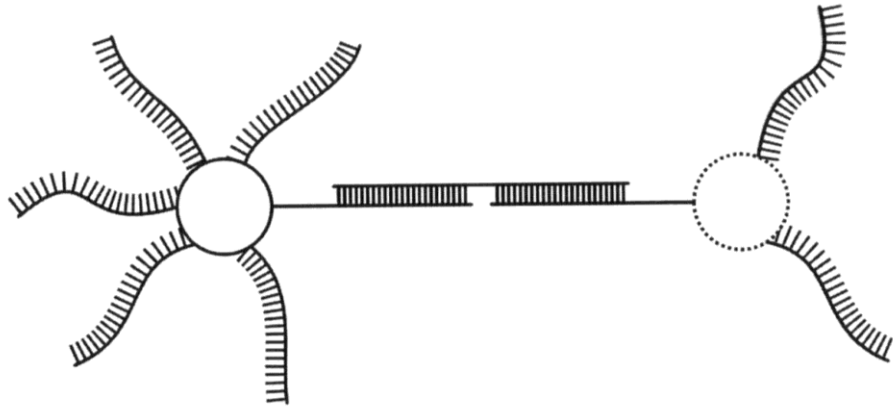


FIG 1

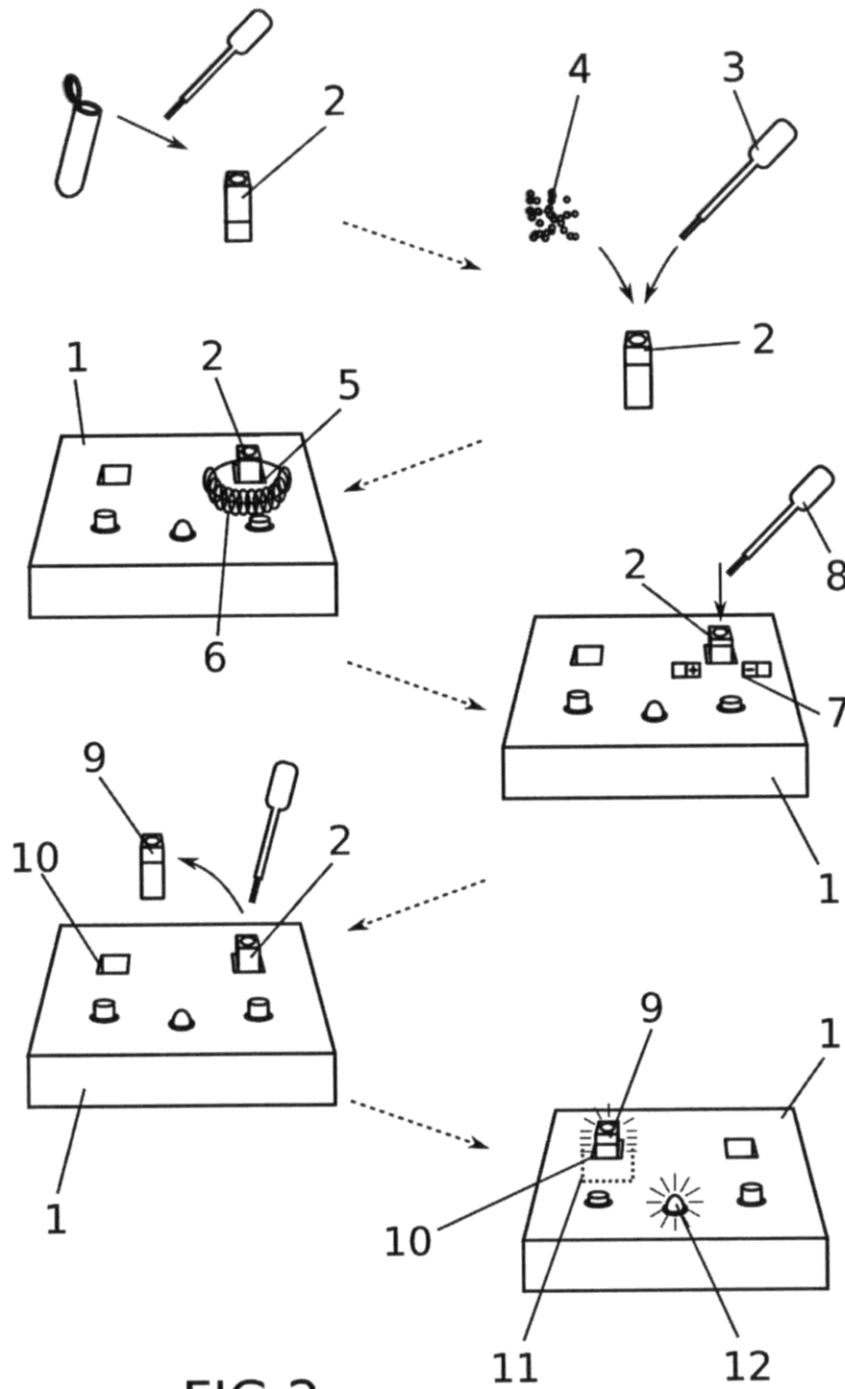


FIG 2



- ②① N.º solicitud: 201700707
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.08.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)
G01N27/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 2270202 A1 (IKONOMOPOULOS, JOHN) 05/01/2011, página 2, párrafo [009]; página 5, párrafo [0038] - página 5, párrafo [0043]; página 7, párrafos [0045], [0046], Reivindicaciones 1-4; Fig. 1.	1-3, 5, 9-14, 16, 17
A	WO 2012034177 A1 (AUSTRALIAN CENTRE FOR PLANT FUNCTIONAL GENOMICS PTY LTD [AU/AU]) 22/03/2012, página 2, línea 26 - página 4, línea 23; página 29, línea 26 - página 31, línea 10; Figs. 1-4.	1-3, 5, 9-14, 16, 17
A	ES 2329986 T3 (RAPID MICRO BIOSYSTEMS, INC.) 03/12/2009, página 6, líneas 43-61; página 11, línea 65 - página 13, línea 6; página 22, línea 1 - página 23, línea 24; página 25, líneas 56-64.	1-3, 5, 9-14, 16, 17
A	WO 2012013731 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]) 02/02/2012, página 3, línea 24 - página 4, línea 16; reivindicaciones 1-10.	1-3, 5, 9-14, 16, 17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº: 1-3,5,9-14, 16, 17

Fecha de realización del informe
21.05.2018

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.