

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 601**

51 Int. Cl.:

B01F 5/10 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

B01F 15/00 (2006.01)

B01F 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014 PCT/GB2014/050634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014 E 14710345 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 2964374**

54 Título: **Aparato de síntesis y método**

30 Prioridad:

05.03.2013 GB 201303913

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

17.03.2021

73 Titular/es:

**TOUHLIGHT IP LIMITED (100.0%)
40 Queen Anne Street, London
W1G 9EL, GB**

72 Inventor/es:

**PORTER, NEIL y
ROTHWELL, PAUL JAMES**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 812 601 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

Aparato de síntesis y método

La presente invención se refiere a un aparato para la síntesis bioquímica, en particular a la síntesis de ADN, ARN, proteínas y moléculas similares, así como a los métodos correspondientes.

5 La amplificación del ADN puede llevarse a cabo mediante el uso de procesos a base de células, como mediante el cultivo de bacterias que propagan un ADN para amplificarlo en fermentadores. También se han descrito procesos enzimáticos libres de células para la amplificación de ADN a partir de una plantilla de partida, incluida la reacción en cadena de la polimerasa y las reacciones de desplazamiento de cadena. Los documentos WO 2010/086626 y WO 2012/017210 describen procesos sin células in vitro para la formación de ADN lineal cerrado mediante el uso de una
10 ADN polimerasa y una protelomerasa.

En el pasado, la amplificación del ADN en una escala de prueba se realizaba utilizando aparatos a base de placas de microtitulación y pipetas controladas robóticamente para agregar componentes de reacción según fuera necesario. Dichos aparatos son adecuados para fabricar pequeñas cantidades de moléculas de ADN con fines de prueba, pero no proporcionan cantidades suficientes para otros fines. La amplificación y fabricación en gran escala de proteínas específicas se ha llevado a cabo principalmente a través de procesos a base de células. Dichos métodos son eficaces para la producción de muy grandes volúmenes de producto, pero costosos de configurar.
15

También hay muchos aparatos disponibles que están específicamente adaptados para amplificar muestras de ADN usando el método termocíclico para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos aparatos son ideales para esa reacción, pero son inflexibles y no pueden adaptarse para realizar otras reacciones. Un ejemplo de un aparato de este tipo se describe en el documento US 8.163.489. El documento WO 02/024317 A1 describe un aparato de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.
20

Por tanto, existe la necesidad de un aparato adaptable que pueda utilizarse para llevar a cabo diversas reacciones bioquímicas en una escala significativa.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un aparato de síntesis según se define en la reivindicación 1 y un método según la reivindicación 10.
25

La presente invención se describirá con más detalle a continuación con referencia a las realizaciones de ejemplo y los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1 es una vista en perspectiva de un aparato de síntesis según una realización de la invención;

Figura 2 es un diagrama esquemático del aparato de la Figura 1;

30 Figura 3 es una vista en sección transversal de un recipiente de reacción de una realización de la invención; y

Figura 4 es un gráfico de la diferencia de presión frente al tiempo en un proceso de ejemplo que utiliza la invención.

En los diversos dibujos, las partes similares se indican mediante referencias similares.

Un aparato de síntesis de acuerdo con la presente invención es capaz de llevar a cabo automáticamente las reacciones deseadas que implican moléculas bioquímicas tales como ADN, ARN y proteínas. Las reacciones se llevan a cabo en un recipiente de reacción con temperatura controlada al que se pueden suministrar varios componentes de reacción en las cantidades deseadas, por ejemplo, volúmenes y en un programa deseado para efectuar la reacción o las reacciones deseadas.
35

En una realización, la temperatura del recipiente de reacción se puede controlar con precisión para seguir un perfil de temperatura deseado en sincronismo con la adición de componentes de reacción y/o extracción de material.

40 En una realización, el recipiente de reacción está dispuesto y provisto de medios para permitir que sus contenidos se agiten y/o mezclen según se desee. En una realización, el recipiente de reacción tiene la forma apropiada de modo que la extracción y el retorno de una cantidad controlada de la mezcla de reacción sirven para mezclar adecuadamente la mezcla de reacción.

En una realización, el recipiente de reacción está dispuesto en forma deseable, de modo que se estrecha hacia su punto más bajo donde se proporciona un soporte de entrada/salida. Por ejemplo, el área de la sección transversal del recipiente de reacción se reduce monótonamente hacia el punto más bajo del recipiente de reacción. En una realización, el recipiente de reacción está provisto de una parte principal que tiene un área de sección transversal constante en toda su altura. En una realización, la sección transversal horizontal del recipiente de reacción es sustancialmente circular en toda su altura.
45

50 En una realización, la relación de aspecto del recipiente de reacción, es decir, la relación entre la altura del recipiente de reacción y el ancho del recipiente de reacción, está en el intervalo de 5:1 a 8:1, preferiblemente en el intervalo de

6:1 a 7:1. En el caso de un recipiente de reacción que no es circular en sección transversal horizontal, la relación de aspecto se determina con referencia a las dimensiones horizontales más grandes. Los términos “horizontal” y “vertical”, como se usan en el presente documento, se refieren al aparato en su orientación normal para su uso.

5 En una realización, los componentes de reacción se almacenan y/o se suministran al recipiente de reacción a una temperatura controlada. En una realización de la invención, el aparato tiene una pluralidad de depósitos de temperatura controlada para componentes de reacción. En una realización, los depósitos de temperatura controlada están provistos de un dispositivo de control de temperatura para establecer una temperatura deseada para el contenido del depósito. En una realización, el dispositivo de control de temperatura comprende un dispositivo de calentamiento/enfriamiento Peltier y/o un calentador resistivo.

10 En una realización de la presente invención, el suministro de componentes de reacción y la extracción de productos de reacción y/o muestras se efectúan mediante una o más bombas de jeringa recíprocas. En una realización de la invención, se proporcionan una o más válvulas de múltiples vías para conectar selectivamente la o cada bomba de jeringa recíproca a un puerto de entrada/salida del recipiente de reacción y/o un depósito.

15 En una realización, la mezcla de reacción se puede retirar del recipiente de reacción al final de una reacción o según se desee durante una reacción, por ejemplo, con fines de muestreo.

En una realización, el aparato se puede operar en modo por lotes o en modo de procesamiento continuo.

En una realización, el aparato es un sistema cerrado para prevenir la entrada de contaminantes.

20 En una realización, al menos un depósito comprende una jeringa extraíble, por ejemplo, una jeringa de polipropileno. En una realización, al menos una de las bombas de jeringa de movimiento recíproco comprende una jeringa extraíble, por ejemplo, una jeringa de vidrio o polipropileno. En una realización, las jeringas de vidrio se silinizan para evitar que el material de ADN se adhiera a las jeringas.

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un aparato 1 de síntesis de acuerdo con una realización de la presente invención. Para facilitar la comprensión y hacer más visibles los componentes principales, en esta Figura se omiten ciertos componentes y conductos de conexión. La Figura 2 es un diagrama esquemático del mismo aparato.

25 El aparato 1 de síntesis está construido sobre un chasis 11 autónomo y provisto de una cubierta 12 frontal que se puede abrir para permitir el acceso a los componentes principales. La cubierta 12 frontal está hecha deseablemente de un material transparente, pero puede estar teñida para proteger los componentes de reacción de niveles de luz excesivos. También sirve para limitar la entrada de contaminantes. El aparato está provisto de un interruptor de alimentación y una entrada 13 de alimentación accesibles desde el exterior, por ejemplo, en un lado del aparato. Además, hay puertos 14 de entrada/salida para permitir que el aparato se comunique y/o sea controlado por un ordenador de propósito general que ejecute software de automatización de laboratorio como, por ejemplo, Labview™ suministrado por National Instruments Corporation of Texas, Estados Unidos. Se proporciona una luz 15 indicadora de funcionamiento en una posición visible desde la parte delantera del aparato e indica si el aparato está en funcionamiento o no.

35 El componente central del aparato de síntesis es un recipiente 2 de reacción encamisado que tiene un volumen superior a 30 ml. En una realización, el volumen del recipiente de reacción es superior a 50 ml. En una realización, el volumen del recipiente de reacción es de aproximadamente 75 o 120 ml. En una realización, el volumen del recipiente de reacción es inferior a 300 ml. En una realización, el volumen del recipiente de reacción es inferior a 200 ml. En una realización, el volumen del recipiente de reacción es inferior a 150 ml. El volumen del recipiente de reacción se puede seleccionar de acuerdo con el uso previsto del aparato y la cantidad de producto que se pretende producir en un lote, o la tasa de producción en un proceso continuo. Claramente, el tamaño del recipiente de reacción establece un límite superior en la cantidad de producto que se puede producir en un lote.

45 En una realización, la relación de aspecto del recipiente de reacción no es mayor de 8:1. En una realización, la relación de aspecto no es mayor de 7:1. Si el recipiente de reacción es demasiado alto, resulta más difícil efectuar una mezcla completa de los contenidos retirando y devolviendo la mezcla de reacción. En una realización, la relación de aspecto no es inferior a 5:1. En una realización, la relación de aspecto no es inferior a 6:1. Si el recipiente de reacción es demasiado ancho, resulta más difícil asegurar una temperatura uniforme en todo momento, especialmente con volúmenes de reacción más pequeños. La agitación de la mezcla puede ayudar a obtener la temperatura deseada en toda la mezcla, especialmente si la mezcla de reacción se calienta a 95 °C. Los recipientes de reacción con relaciones de aspecto dentro de los límites anteriores son adaptables a diferentes cantidades de componentes de reacción.

50 Un recipiente 2 de reacción utilizable en una realización de la invención se muestra en sección transversal en la Figura 3. El recipiente 2 de reacción comprende un recipiente 23 interior rodeado por una camisa 25. El fluido de control de temperatura circula a través del espacio 26 entre el recipiente 23 interior y la camisa 25 para controlar la temperatura del contenido del recipiente 23 interior. El puerto 27 inferior y el puerto 28 superior se proporcionan para conectar el recipiente interior a las válvulas 32b, 32a de selección, respectivamente.

En una realización de la invención, el recipiente 23 interior tiene una parte principal que tiene la forma de un cilindro

de diámetro D1, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 50 mm, preferiblemente de 25 a 35 mm, y una parte ahusada 24 que conecta la parte cilíndrica al puerto 27 inferior. La altura total H1 del recipiente interior está, en una realización, en el intervalo de 150 mm a 300 mm, deseablemente 200 mm a 250 mm. La altura de la parte ahusada 24 está, en una realización, en el intervalo de 5 a 20 mm, preferiblemente de 10 a 15 mm. El ángulo de las paredes laterales de la parte ahusada está en el intervalo de 30 a 60° con respecto al eje del recipiente interior, preferiblemente alrededor de 45°. El diámetro D2 del puerto 27 inferior está en el intervalo de 5 a 10 mm.

En una realización de la invención, el recipiente de reacción tiene una sección transversal no constante, por ejemplo, tiene un cono hacia abajo en toda su altura o un abultamiento central.

La temperatura del recipiente de reacción se controla mediante un flujo de fluido de control de temperatura a través de la camisa exterior al recipiente de reacción. El fluido de control de temperatura se suministra por la entrada 2a y se retira de la salida 2b mediante un dispositivo 22 de control de temperatura de recirculación. El dispositivo de control de temperatura de recirculación controla la temperatura del fluido de control de temperatura calentando y/o enfriando el fluido. El recipiente de reacción se puede mantener a una temperatura constante, por ejemplo, a pesar de la aparición de reacciones endotérmicas o exotérmicas, o puede controlarse para seguir un perfil de temperatura deseado. El fluido de control de temperatura puede ser agua o aceite. En una realización, el fluido de control de temperatura se suministra a través de los puertos 16 provistos en el chasis del aparato. Un dispositivo de control de temperatura de recirculación adecuado es el sistema de control de temperatura Presto A30 fabricado por Julabo USA, Inc. de Pennsylvania, Estados Unidos. En una realización de la invención, el dispositivo 22 de control de temperatura de recirculación comprende calentadores óhmicos y/o dispositivos Peltier. En una realización, la temperatura del recipiente de reacción se puede controlar a una temperatura en el intervalo de 4 °C a 95 °C con una precisión de 0,01 °C.

Esta realización de la presente invención está provista de depósitos 4a-4c de temperatura controlada para los componentes de reacción que se utilizarán en la reacción de síntesis. Los componentes de reacción se mantienen en jeringas 42a-42c, por ejemplo, jeringas de polipropileno desechables, que están montadas en dispositivos 41a-41c de control de temperatura. Los dispositivos de control de temperatura en esta realización comprenden bloques de material conductor, por ejemplo, aluminio, que tienen orificios para recibir de cerca a las jeringas 42a-42c. Puede proporcionarse una pasta termoconductora si se desea aumentar la conductividad térmica entre el bloque y las jeringas. Se unen dispositivos de calefacción/refrigeración, por ejemplo, calentadores óhmicos o dispositivos Peltier a los bloques térmicamente conductores para controlar su temperatura y, por tanto, de los componentes de reacción almacenados en los depósitos 42a-42c.

Los dispositivos 41a-41c de control de temperatura pueden usarse para calentar o enfriar los componentes de reacción almacenados. Algunos componentes de reacción se mantienen deseablemente a baja temperatura, por ejemplo, aproximadamente 4 °C, con el fin de evitar su degradación. Los cebadores se pueden almacenar a una temperatura elevada para prevenir y/o reducir el oscurecimiento del cebador. Los depósitos también se pueden calentar para desnaturalizar y templar las plantillas y los cebadores antes de la adición al recipiente de reacción. Al igual que con el control de temperatura principal del recipiente de reacción, los depósitos de temperatura controlada pueden mantenerse a una temperatura constante o seguir un perfil de temperatura deseado, por ejemplo, para calentar un componente de reacción justo antes de añadirlo al recipiente de reacción. En una realización, las temperaturas de los depósitos de temperatura controlada se pueden controlar en forma independiente dentro de un intervalo de 4 °C a 95 °C con una precisión de 0,01 °C.

En una realización, se proporcionan uno o más calentadores en línea (no mostrados) para elevar la temperatura, por ejemplo, a 95 °C, de un componente de reacción como un cebador antes de la adición al recipiente de reacción. El calentador, o uno de los calentadores, se proporciona en el conducto entre un depósito 4a-c, 5a-g y la válvula 32c de selección y/o entre la válvula 32a de selección y el recipiente 2 de reacción.

En esta realización, uno de los depósitos 4c de temperatura controlada comprende dos jeringas 42c y 42c' de depósito en contacto térmico con un solo bloque 41c de control de temperatura. Esto es útil cuando es necesario mantener dos componentes de reacción a la misma temperatura o cuando se requiere un volumen mayor de un solo componente de reacción para una reacción deseada.

El aparato también comprende una pluralidad de depósitos 5a-5g adicionales que no están provistos de dispositivos de control de temperatura. En esta realización, hay siete de tales depósitos, en otras realizaciones se proporcionan más o menos. Los depósitos 5a-5g adicionales también pueden comprender jeringas, por ejemplo, jeringas de vidrio o de polipropileno, que se pueden quitar y desechar cuando están vacías. El uso de jeringas es ventajoso ya que el volumen del depósito se reduce automáticamente a medida que se extraen los componentes de la reacción. Se puede lograr un efecto similar con bolsas o tubos plegables. Si se utiliza un recipiente rígido, es deseable que se proporcione un filtro en cualquier ventilación a la atmósfera para evitar la entrada de contaminantes.

Convenientemente, se proporciona un soporte 51 giratorio para montar los depósitos 5. Si se requiere un componente de reacción en grandes cantidades, el aparato puede estar provisto de puertos para conectarse a un depósito externo. De manera deseable, el aparato está dispuesto para minimizar las longitudes de conducto necesarias para conectar los depósitos a las válvulas de selección. En una realización, los conductos se pueden separar de los depósitos y

luego se pueden unir a un colector que está conectado a un suministro de líquido limpiador o agua de enjuague. De esta forma, todo el aparato se puede limpiar in situ, es decir, sin desmontarlo.

5 En una realización, los depósitos 4a-c y 5a-g tienen una capacidad de 3 a 10 ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ml. Pueden proporcionarse uno o más depósitos más grandes, por ejemplo, para soluciones tampón, con una capacidad de 10 a 500 ml, por ejemplo, de aproximadamente 250 ml.

10 El suministro de un componente de reacción al recipiente de reacción se efectúa mediante una bomba 3a de jeringa de movimiento recíproco. Esta bomba se conoce como bomba de suministro. Este comprende una jeringa 31a, por ejemplo, una jeringa de vidrio o de polipropileno, accionada por un solenoide 33a y conectada a una válvula 32a de selección controlable para conectar selectivamente el solenoide a cada uno de los depósitos y al recipiente de reacción. Para agregar una cantidad controlada de un componente de reacción al recipiente de reacción, la válvula 32a de selección se usa primero para conectar la jeringa de la bomba al depósito relevante, luego se acciona el solenoide para extraer en la jeringa el volumen relevante del componente de reacción. A continuación, la válvula 32a de selección se usa para conectar la jeringa 31a al recipiente 2 de reacción y el solenoide se invierte para expulsar el contenido de la jeringa al recipiente de reacción. Con esta disposición, es posible agregar rápidamente cantidades de componentes de reacción deseados secuencialmente al recipiente de reacción sin requerir múltiples bombas de jeringa y múltiples entradas al recipiente de reacción. Sin embargo, si es deseable añadir múltiples componentes de reacción simultáneamente al recipiente de reacción, es posible proporcionar múltiples bombas 3a de suministro. Esto también puede ser deseable si es necesario mantener ciertos componentes de reacción absolutamente separados antes de su adición al recipiente de reacción.

20 En esta realización, se utiliza una segunda bomba 3b de jeringa de movimiento recíproco para agitar el contenido del recipiente de reacción así como para eliminar la mezcla de reacción o el producto al final de la reacción o con fines de muestreo durante un proceso de reacción. Esta bomba se denomina bomba de extracción y comprende una jeringa 31b accionada por un solenoide 33b. La segunda bomba 3b de jeringa está conectada a una salida en el fondo del recipiente de reacción a través de una segunda válvula 32b de selección. Para agitar el contenido del recipiente de reacción, se usa la segunda válvula 32b de selección para conectar la jeringa 31b al recipiente de reacción mientras se extrae una cantidad de la mezcla de reacción del recipiente de reacción y luego se devuelve al mismo. La cantidad de la mezcla de reacción que se retira y la velocidad a la que se devuelve pueden controlarse para controlar el grado de agitación que se efectúa. Tal agitación se puede efectuar en forma continua a lo largo de una reacción, periódicamente o en momentos específicos relacionados con la adición de componentes de reacción.

30 En una realización, la segunda bomba 3b de jeringa de movimiento recíproco también está conectada al depósito 4a y puede usarse para suministrar el componente de reacción almacenado en ese depósito al recipiente 2 de reacción.

35 Se proporciona un sensor 82 de presión en un ramal corto conectado al conducto entre el recipiente 2 de reacción y la válvula 32b de selección o entre la válvula 32b de selección y la bomba 3b de extracción. Durante la extracción y el retorno de material desde o hacia el recipiente 2 de reacción, la presión medida por el sensor 82 es indicativa de la viscosidad de la mezcla que se transfiere: cuanto mayor es la presión, mayor es la viscosidad. En particular, la amplitud de las variaciones de presión durante la extracción cíclica y el retorno de material es indicativa de la viscosidad de la mezcla de reacción. La relación exacta entre la presión y la viscosidad depende de varios factores, incluida la velocidad de extracción o devolución del material, el diámetro de los conductos utilizados y la geometría del recipiente de reacción. Esta relación se puede determinar teóricamente o mediante calibración. En una realización, la relación exacta no es necesaria y las señales del sensor 82 de presión pueden usarse simplemente para detectar cambios en la mezcla de reacción sin conocer su viscosidad exacta. En una reacción donde la viscosidad aumenta debido a la formación de producto, la señal del sensor de presión puede usarse para controlar la reacción. Activando la bomba para administrar uno o más reactivos apropiados de uno o más de los depósitos a una velocidad apropiada o en una cantidad apropiada basada en la señal de presión, es posible incrementar el rendimiento del producto. En otros casos, la señal de presión puede indicar la finalización de la reacción o una etapa de la reacción y, por lo tanto, puede usarse para iniciar la recolección del producto o la adición de componentes para una etapa siguiente.

50 En una realización de la invención, se usa una señal del sensor 82 de presión para controlar la velocidad de extracción y/o retorno de la mezcla al recipiente de reacción para asegurar que el material de ADN en la mezcla no sea dañado por fuerzas de cizallamiento. En una realización, la velocidad de extracción y/o el retorno de la mezcla se controlan para asegurar que no se exceda un límite de presión. El límite de presión puede depender de la viscosidad.

55 El presente inventor ha determinado que la agitación por eliminación y retorno de la mezcla de reacción es particularmente eficaz cuando se usa con un recipiente de reacción de un tamaño, forma y relación de aspecto como se describió anteriormente. Este método de agitación también es eficaz para una amplia gama de volúmenes de mezcla de reacción. Esta configuración también tiene las ventajas de que no requiere ningún componente, como deflectores, dentro del recipiente de reacción que pueda ser difícil de limpiar.

Para eliminar material, por ejemplo, producto de reacción del recipiente de reacción, la bomba 3b de extracción se conecta primero al recipiente de reacción mediante la segunda válvula 32b de selección y el solenoide se acciona para retirar el pistón de la jeringa a fin de extraer material del recipiente 2 de reacción. La bomba de extracción es luego conectada a un puerto 7 de salida por la segunda válvula de selección y el solenoide 33b es activado para expulsar el

material recolectado a través del puerto 7 de salida.

El puerto 7 de salida puede conectarse, por ejemplo, a un recipiente para el producto de reacción, un recipiente de muestra, un dispositivo de medición o cualquier otro aparato. También es posible que una muestra que se haya extraído con fines de medición se devuelva al recipiente de reacción después de la medición.

5 En una realización de la invención, la bomba 3b de extracción tiene una capacidad mayor que la bomba 3a de suministro de modo que, por ejemplo, todo el recipiente de reacción se puede vaciar en una sola operación de bombeo. Una capacidad tan grande para la bomba 3b de extracción también es deseable para ayudar a limpiar el aparato descargando grandes volúmenes de solución limpiadora y/o agua desionizada a través de todo el sistema. Con este fin, el aparato puede estar provisto de grandes depósitos adicionales para contener cantidades suficientes de solución de limpieza y agua desionizada.

10 En una realización de la invención, se usa una sola bomba para suministrar componentes de reacción, para agitar la mezcla de reacción y para retirar la mezcla de reacción y/o producto.

En una realización de la invención, la bomba 3a de suministro y/o la bomba 3b de extracción comprenden otra forma de bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica.

15 El aparato también comprende un recipiente 6 de residuos que está conectado a la atmósfera a través de un respiradero 62 que puede estar provisto de una válvula unidireccional. El recipiente 6 de residuos está conectado a la parte superior del recipiente 2 de reacción para proporcionar un respiradero y evitar la acumulación de presión en el recipiente 2 de reacción. También se proporcionan conductos para conectar el recipiente 6 de residuos con las válvulas 32a y 32b de selección para permitir el vertido del producto del recipiente de reacción y cualquier componente de reacción no utilizado y no deseado. El recipiente de residuos también se puede usar para recibir fluidos de limpieza y enjuague durante la limpieza y enjuague in situ, así como pequeñas cantidades de componentes de reacción del cebado de los conductos para permitir la entrega exacta de las cantidades deseadas al recipiente de reacción.

20 En una realización, el recipiente 6 de residuos se puede omitir. En este caso, es deseable proporcionar una válvula de seguridad al recipiente 2 de reacción y proporcionar conexiones desde las válvulas 32a, 32b de selección a un drenaje externo.

25 El funcionamiento del aparato está controlado por un controlador 8 que está conectado eléctricamente a los dispositivos 41a-c de control de temperatura, a las jeringas 32a-b de selección, a los solenoides 33a-b, al dispositivo 22 de control de temperatura y al sensor 82 de presión, de modo de controlar esos componentes del aparato. El controlador 8 también comprende una interfaz 81 que permite la conexión a un ordenador 9 externo para el control general del proceso por realizar.

30 En una realización, el controlador 8 está preprogramado para realizar rutinas específicas de uso común tales como cebado, muestreo, recolección, enjuague y limpieza. En una realización, el controlador 8 simplemente pasa órdenes desde el ordenador 9 externo a los diferentes componentes del aparato. Las rutinas mencionadas se pueden realizar bajo el control de un ordenador externo o manualmente.

35 En una realización, cebar el aparato comprende extraer los componentes de reacción de cada uno de los depósitos que se utilizarán de modo que los conductos entre los depósitos y las válvulas de selección se llenen con el componente de reacción respectivo. Esto es deseable para aumentar la precisión en las cantidades de componentes de reacción suministrados al recipiente de reacción y reduce las posibilidades de contaminación. En una realización, tomar muestras de la mezcla de reacción comprende retirar una cantidad predeterminada del componente de reacción a un recipiente o sensor externo durante el curso de una reacción. En algunos casos, es posible devolver la muestra al recipiente de reacción. En una realización, la recolección comprende retirar parte o la totalidad del producto de reacción al final de un proceso por lotes o en un momento apropiado en un proceso continuo. En una realización, el enjuague comprende enjuagar los conductos y depósitos usados con agua pura. En una realización, la limpieza del aparato comprende enjuagar conductos y depósitos con una solución de limpieza.

40 En un método de la invención, se agrega una pluralidad de componentes de reacción a un recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción. Se extrae una parte de la mezcla de reacción del recipiente de reacción y se devuelve al mismo para agitar la mezcla de reacción y asegurar su mezcla. Al final de la reacción, el producto de reacción se retira del recipiente de reacción. En una realización, la mezcla de reacción se extrae de un puerto provisto en la parte inferior del recipiente de reacción, preferiblemente en el punto más bajo del recipiente de reacción. En una realización, la parte de la mezcla de reacción que se elimina asciende al 50% o menos de la mezcla de reacción total, deseablemente al 40% o menos, preferiblemente al 30% o menos. En una realización, la parte de la mezcla de reacción que se elimina asciende al 5% o más de la mezcla de reacción total, deseablemente al 10% o más, preferiblemente al 20% o más.

Ejemplo

55 Ahora se describirá un ejemplo de un método de síntesis de ADN usando un aparato de acuerdo con una realización de la invención.

Primero se limpió y descontaminó el aparato. Los tubos se desconectaron de los 10 depósitos de reactivo (42a, 42b, 42c', 42c, 5a a 5g) y se volvieron a conectar mediante accesorios Luer a un colector de 10 posiciones alimentado desde un depósito de 120 ml que contenía solución de hipoclorito de sodio al 10%. De manera similar, se conectó un depósito de 60 ml de solución de hipoclorito de sodio al 10% al puerto 7 de salida de la válvula 32b de selección. Controlando las posiciones de las válvulas 32a y 32b de selección y las acciones de los solenoides 33a y 33b en las jeringas 31a y 31b de vidrio de 5 ml, respectivamente, todo el sistema, incluido el recipiente 2 de reacción, se llenó completamente con solución de hipoclorito de sodio sin espacios muertos. Se extrajo un mínimo de 5 ml de solución a través de cada tubo. El recipiente de reacción (capacidad de 120 ml) se calentó a 50 °C mediante la acción de control en el termocirculador 22, y el sistema se mantuvo en este estado durante un período de 30 minutos. Este procedimiento aseguró que todo el ADN contaminante dentro de todos los tubos de alimentación y el propio recipiente de reacción se destruyera por completo.

De manera similar, mediante el uso de un programa apropiado para controlar las válvulas de selección y los solenoides descritos anteriormente, todo el sistema se vació de la solución de hipoclorito de sodio al colocarlo en el recipiente 6 de residuos. La repetición del proceso anterior 5 veces después de reemplazar la solución de hipoclorito de sodio en los depósitos con agua desionizada aseguró la eliminación completa de cualquier hipoclorito de sodio residual de todo el sistema y lo dejó listo para su uso.

Luego, los tubos se desconectaron del colector y se volvieron a conectar a los 10 depósitos de reactivos que comprendían jeringas de polipropileno desechables estériles con accesorios Luer lock (capacidad de 5 ml a 20 ml). Donde se indica a continuación, estas jeringas contenían componentes de reacción individuales en un volumen mínimo de 2 ml. De lo contrario, se quedaron vacíos con los émbolos completamente presionados. El depósito 5d constaba de dos jeringas de 60 ml en paralelo para dar una capacidad total de 120 ml de agua desionizada. En las jeringas que contienen reactivos, el aire de cada cilindro de jeringa se expulsó, después del llenado, presionando manualmente el émbolo hasta que el líquido escapó por la salida de la jeringa. Durante este procedimiento, la salida de la jeringa se mantuvo verticalmente por encima del émbolo de la jeringa para permitir la expulsión de todo el aire del cilindro.

Tabla 1

Orden de adición	Depósito	Temp del depósito °C	Reactivo	Concentración	Volumen dispensado	Concentración en el reactor
1	5a	Temperatura ambiente	Plantilla circular de ADN DB-Cal092	1 mg/ml	400 µl	10 µg/ml
2	5b	Temperatura ambiente	Cebador de oligonucleótido NO-7	1 mM	400 µl	10 µM
3	5c	Temperatura ambiente	KOH	1 M	400 µl	10 mM
4	5f	Temperatura ambiente	10 x tampón 300 mM de Tris-HCl, pH 7,5 300 mM de KCl 75 mM de MgCl ₂ 50 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM de DTT		4 ml	30 mM de Tris-HCl, pH 7,5 30 mM de KCl 7,5 mM de MgCl ₂ 5 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 mM de DTT
5	42c	4,0	Phi29 ADN polimerasa	10.000 unidades/ml	800 µl	200 unidades/ml
6	42c'	4,0	Pirofosfatasa	200 unidades/ml	80 µl	0,4 unidades/ml
7	5e	Temperatura ambiente	dNTPs	100 mM	800 µl	2 mM
8	5d	Temperatura ambiente	H ₂ O		33,12 ml	

Los reactivos enzimáticos Phi29 ADN polimerasa y pirofosfatasa, en los depósitos 42c y 42c', respectivamente, se mantuvieron en condiciones estables a 4 °C mediante el dispositivo 41c de control de temperatura. Todos los demás reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente.

Para lograr una dispensación precisa de reactivos en el recipiente 2 de reacción, los tubos entre los depósitos de reactivo y las válvulas 32a y 32b de selección se cebaron extrayendo secuencialmente cantidades muy pequeñas de los reactivos y distribuyéndolos en el recipiente 6 de residuos.

Para desnaturalizar la plantilla de ADN y unir el cebador de oligonucleótidos, los reactivos de los depósitos 5a, 5b y 5c se dispensaron a través de la válvula 32a de selección (mediante la acción del solenoide 33a en la jeringa 31a) en una jeringa vacía cerrada de 5 ml (depósito 42b). La temperatura de este depósito se controló mediante el dispositivo 41b de control de temperatura. Se utilizó la acción de control sobre 41b para elevar su temperatura a 95 °C durante 3 minutos y luego enfriar a 30 °C. Los componentes de reacción combinados en el depósito 42b se distribuyeron luego

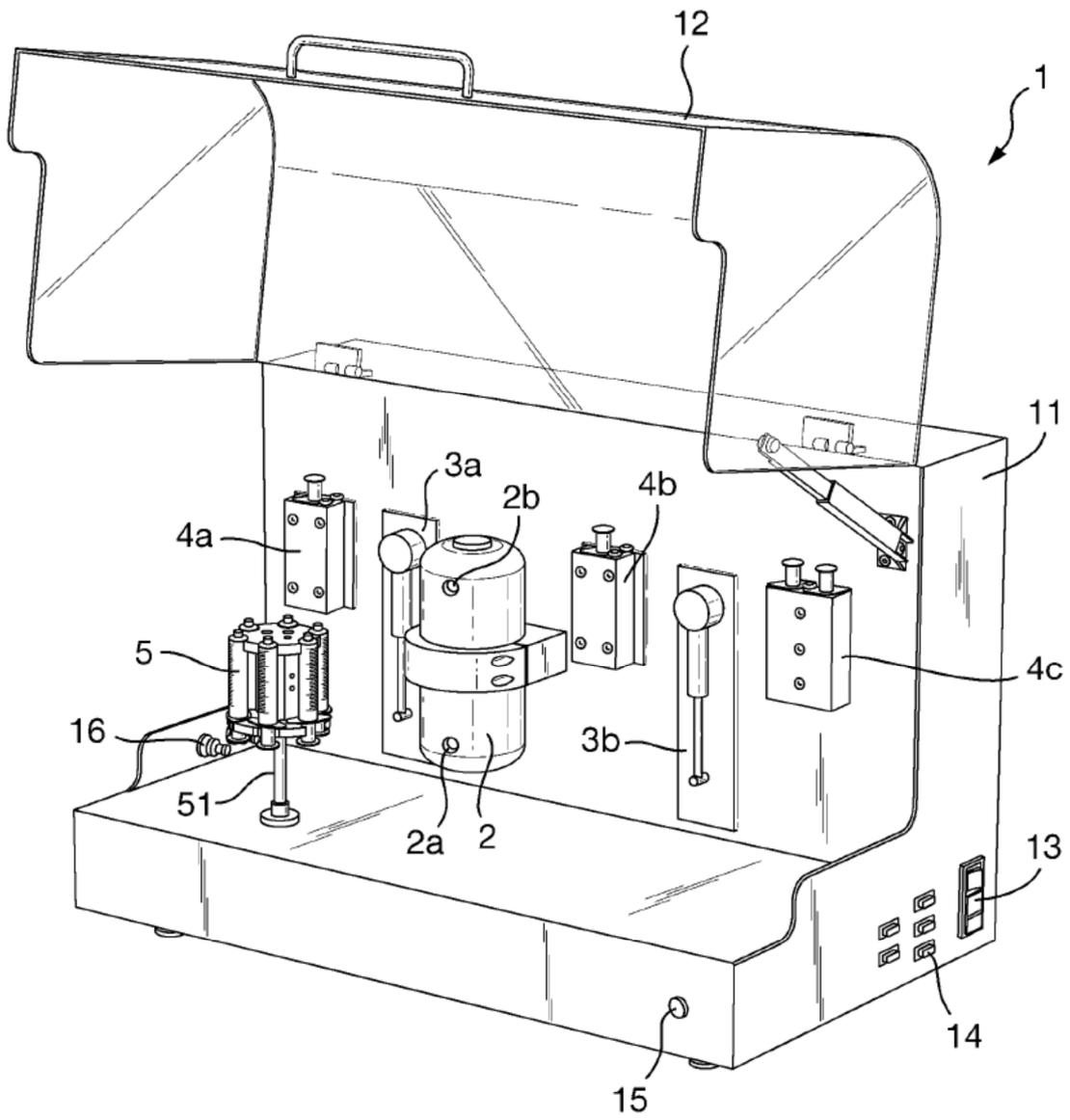
- 5 en el recipiente 2 de reacción a través de la válvula 32a de selección. Los 5 componentes de reacción restantes se distribuyeron secuencialmente a través de la válvula 32a de selección en el orden que se muestra en la Tabla 1, de manera que el volumen final en el recipiente 2 de reacción fue de 40 ml. La temperatura del recipiente 2 de reacción se fijó en 30 °C mediante la acción de control en el termocirculador 22. Los componentes de reacción no se expusieron a temperaturas superficiales superiores a 2 °C por encima del punto de ajuste.
- La mezcla de los componentes de reacción se logró mediante la acción de control en el solenoide 33b y, posteriormente, en el movimiento de la jeringa 31b de mezcla. Se controló la acción de la jeringa para retirar y regresar al recipiente de reacción 2,5 ml de componentes de reacción. La mezcla fue discontinua con la jeringa activada durante 10 minutos a intervalos de aproximadamente 2 horas a una velocidad de extracción/dispensación de 70 ml/min.
- 10 El cambio de presión en el tubo entre el recipiente 2 de reacción y la jeringa 31b se midió mediante un sensor 82 de vacío y presión (Modelo ZSE30-01-26, SMC Corporation, Tokio, Japón). Este sensor mide diferencias de presión de -101 a +101 kPa (-1000 a +1000 mbar) y se conectó a través de una pieza en T utilizando una sección corta de tubería de PTFE de 1/8 de pulgada de diámetro. La señal de salida del sensor (0-5V) se controló utilizando un registrador de datos Pico Technology USB TC-O8 (Pico Technology, Cambridge, Reino Unido). El registrador de datos se programó para registrar la salida de mV del sensor a intervalos de 400 milisegundos y la salida se trazó en tiempo real durante el curso de la reacción.
- 15 La acción recíproca de la jeringa de mezcla dio como resultado una salida gráfica que mostraba picos de alta y baja presión. Con todas las demás variables fijas, como la velocidad de la jeringa, el material del tubo, el diámetro interno y la longitud y el tamaño y la geometría de la válvula de selección, cualquier cambio en la altura del pico solo podría deberse a un cambio en la viscosidad de los componentes de reacción. Los cambios de presión muy pequeños que podrían atribuirse a la temperatura ambiental y las fluctuaciones de presión no se compensaron en los cálculos de diferencia de presión.
- 20 Durante el proceso, la acción de la Phi029 ADN polimerasa sobre la plantilla circular de ADN, DB-Cal092 produce repeticiones concatémicas lineales largas de la plantilla que pueden extenderse a 70 kilobases o más, y la reacción termina cuando una o más de las reacciones los componentes están agotados. Primero se producen cadenas largas de ADN que luego actúan como plantilla para que la polimerasa produzca la cadena complementaria. La composición del producto al final de la reacción puede incluir tanto ADN concatémico monocatenario como bicatenario que aumentan la viscosidad.
- 25 La medición de este cambio en la viscosidad se refleja en el aumento en el diferencial de presión registrado por el sensor como se muestra en la Figura 4, que representa la diferencia de presión P en mbar frente al tiempo T en horas. Puede verse que, en el transcurso de aproximadamente 14 horas, la diferencia de presión P aumentó de aproximadamente 225 mbar a aproximadamente 290 mbar. El aumento fue monótono, pero no del todo lineal, fluctuando la tasa de aumento alrededor del promedio.
- 30 El aumento de la presión diferencial observado durante el curso de la reacción puede explicarse por el aumento de la viscosidad de la solución debido a la producción de ADN. La confirmación de este aumento se confirmó mediante el examen visual de las muestras extraídas; estos mostraron un aumento gradual en su capacidad para retener las burbujas de aire atrapadas a medida que avanzaba la reacción.
- 35 La invención se ha descrito únicamente con referencia a realizaciones ejemplares y no debe interpretarse como limitada a las mismas, sino que incluye variaciones y modificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de síntesis (1) que comprende:
- un recipiente (2) de reacción que tiene un primer puerto (27) inferior y un segundo puerto (28) superior;
- un dispositivo (22) de control de temperatura para controlar la temperatura del recipiente de reacción;
- 5 una pluralidad de depósitos (4a-4c, 5a-5g) para contener componentes de reacción;
- una pluralidad de conductos, donde cada uno de la pluralidad de conductos está conectado el segundo puerto (28) superior del recipiente (2) de reacción con uno respectivo de la pluralidad de depósitos;
- un medio (3a) de suministro para suministrar selectivamente cantidades controladas de componentes de reacción mantenidos en la pluralidad de depósitos (4a-4c, 5a-5g) al recipiente (2) de reacción en los momentos deseados; y
- 10 medios de control para controlar los medios (3a) de suministro y los medios (3b) de agitación, caracterizado porque el aparato comprende, además, un sensor (82) de presión que mide la presión del contenido en un conducto que conecta los medios (3b) de agitación al recipiente (2) de reacción, en el que el medio (3b) de agitación está configurado para retirar selectivamente una cantidad de contenido del recipiente (2) de reacción a través del primer puerto (27) inferior del mismo y devolver selectivamente el contenido extraído al recipiente (2) de reacción a través del primer puerto (27)
- 15 inferior del mismo, y el sensor (82) de presión detecta un cambio de presión en el conducto que conecta los medios (3b) de agitación al recipiente (2) de reacción y envía una señal a los medios de control y los medios de control controlan los medios (3b) de agitación en respuesta a un cambio en la presión medida.
2. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el recipiente (2) de reacción está dispuesto de manera que se estrecha hacia su punto más bajo y tiene un puerto de entrada/salida en el punto más bajo.
- 20 3. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la relación de aspecto del recipiente (2) de reacción está en el intervalo de 5:1 a 8:1, preferiblemente en el intervalo de 6:1 a 7:1.
4. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo (22) de control de temperatura está dispuesto para controlar la temperatura del recipiente (2) de reacción para seguir un perfil de temperatura deseado en sincronismo con la adición de componentes de reacción y/o extracción de material.
- 25 5. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, además, un dispositivo (41a-41c) de control de temperatura del depósito dispuesto para controlar la temperatura de un componente de reacción contenido en al menos uno de los depósitos (4a-4c).
6. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo (41a-41c) de control de temperatura comprende un termocirculador, un dispositivo de calentamiento/enfriamiento Peltier y/o un calentador resistivo.
- 30 7. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios (3a) de suministro y los medios (3b) de agitación comprenden bombas de jeringa de movimiento recíproco.
8. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios (3a) de suministro y/o los medios (3b) de agitación comprenden una válvula (32a, 32b) de múltiples vías dispuesta para conectar selectivamente los medios de suministro y/o los medios de agitación al primer (27) o al segundo (28) puerto del
- 35 recipiente (2) de reacción y/o un depósito (4a-4c).
9. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos un depósito (4a-4c) comprende una jeringa extraíble, por ejemplo, una jeringa de vidrio o polipropileno.
10. Un método de síntesis realizado usando el aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende: añadir una pluralidad de componentes de reacción al recipiente (2) de reacción para formar una mezcla de reacción; usar los medios (3b) de agitación para retirar una parte de la mezcla de reacción del recipiente (2) de
- 40 reacción y devolver la parte extraída al mismo para agitar la mezcla de reacción y asegurar su mezcla; medir la presión de la mezcla de reacción en un conducto que conecta los medios (3b) de agitación al recipiente (2) de reacción y controlar la velocidad de extracción y retorno en base a la presión medida; y retirar el producto de reacción del
- 45 recipiente (2) de reacción al final de la reacción.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mezcla de reacción se retira del puerto (27) inferior provisto en la parte inferior del recipiente (2) de reacción, preferiblemente en el punto más bajo del recipiente de reacción.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la parte extraída de la mezcla de reacción asciende al 50% o menos de la mezcla de reacción total, deseablemente al 40% o menos, preferiblemente al 30% o menos.
- 50 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, 11 o 12, en el que la parte extraída de la mezcla de reacción asciende al 5% o más de la mezcla de reacción total, deseablemente al 10% o más, preferiblemente al 20% o más.

14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende, además, retirar una muestra de la mezcla de reacción antes del final de la reacción.

Fig. 1



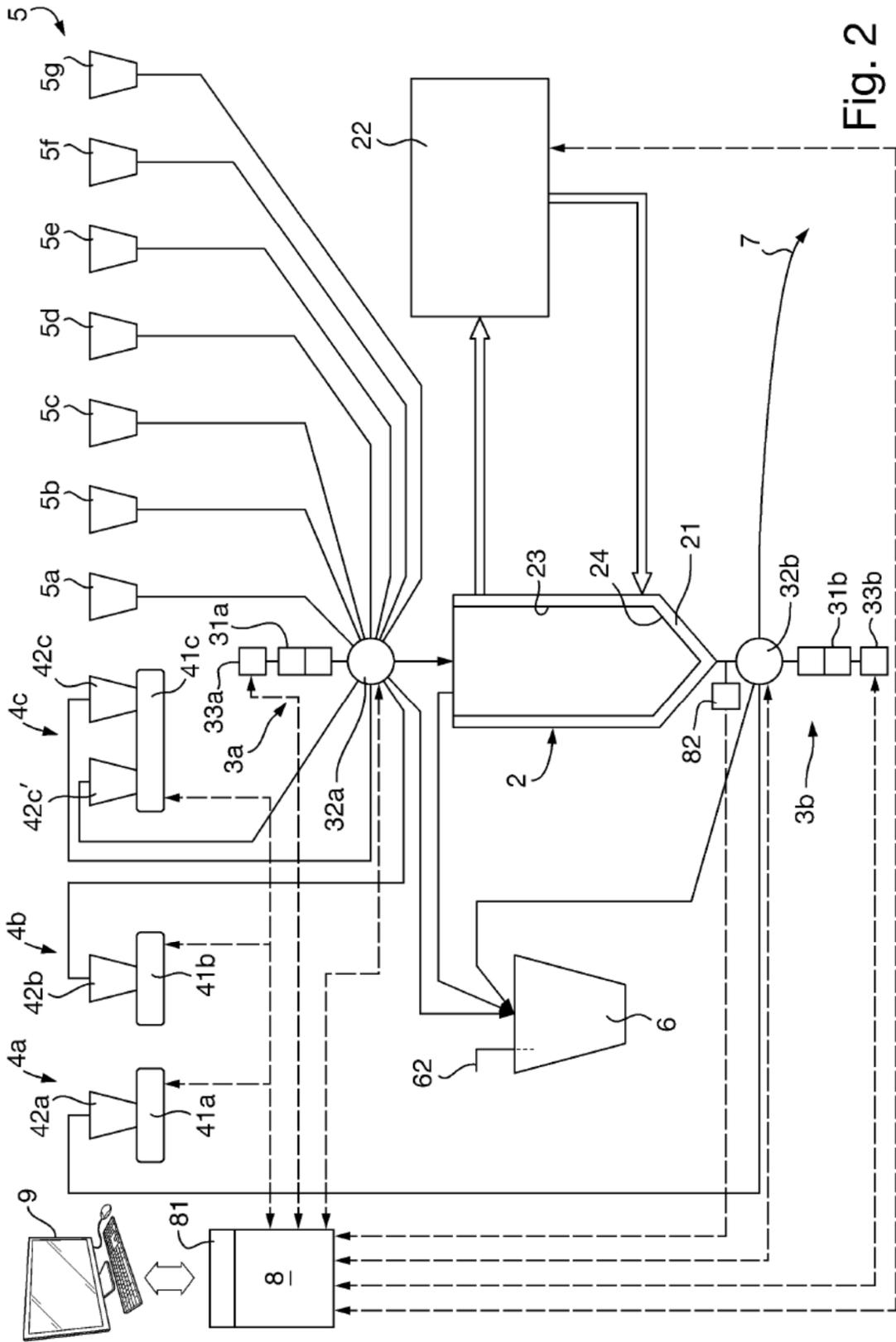


Fig. 2

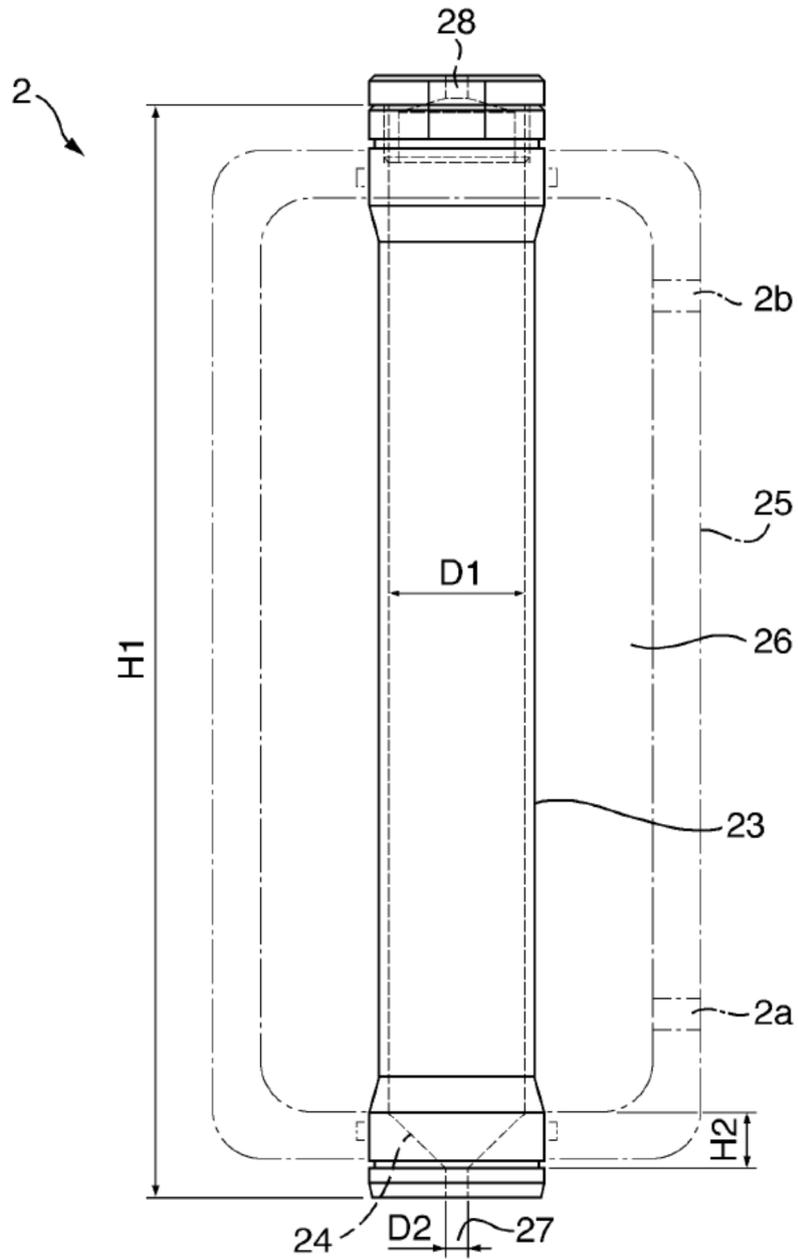


Fig. 3

Fig. 4

