



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 777**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/26** (2006.01)

**G01N 27/26** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**B41J 2/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06849949 .0**

96 Fecha de presentación : **11.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2016091**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54

Título: **Bioquímica basada en gotas.**

30

Prioridad: **18.04.2006 US 745058 P**  
**18.04.2006 US 745039 P**  
**18.04.2006 US 745073 P**  
**18.04.2006 US 745059 P**  
**28.04.2006 US 745950 P**  
**28.04.2006 US 745914 P**  
**09.05.2006 US 746801 P**  
**09.05.2006 US 746797 P**  
**30.06.2006 US 806412 P**  
**12.07.2006 US 807104 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2011**

73

Titular/es: **ADVANCED LIQUID LOGIC, Inc.**  
**P.O. Box 14025 615 Davis Drive, Suite 800**  
**Research Triangle Park, North Carolina 27709, US**  
**Duke University**

72

Inventor/es: **Pollack, Michael, G.;**  
**Pamula, Vamsee, K.;**  
**Srinivasan, Vijay;**  
**Paik, Philip, Y.;**  
**Eckhardt, Allen, E. y**  
**Fair, Richard, B.**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

**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

**1 Campo de la Invención**

5 La invención se refiere a un microaccionador de gotas y a sistemas, aparatos y procedimientos que emplean el microaccionador de gotas para ejecutar diversos protocolos usando gotas separadas. La invención es útil, por ejemplo, en la ejecución de protocolos para la realización de ensayos bioquímicos y/o biológicos. La invención también se refiere a sistemas y procedimientos para ejecutar protocolos basados en gotas.

**2 Antecedentes de la Invención**

10 La capacidad para realizar rápidamente ensayos bioquímicos y de otro tipo es crítica en una amplia diversidad de campos. Por ejemplo, un diagnóstico rápido y preciso de enfermedad infecciosa es crucial tanto para la gestión eficaz de la enfermedad en sujetos individuales como para la mejoría de los problemas de salud pública de patógenos con multiresistencia a fármacos e infecciones extrahospitalarias.

15 Los procedimientos de amplificación de ADN basados en PCR actuales experimentan varios inconvenientes incluyendo el alto coste de los reactivos, la intensidad de la mano de obra y la susceptibilidad a contaminación cruzada. Además, en comparación con el cultivo, los ensayos de PCR son menos capaces de ensayar simultáneamente múltiples especies, factores de virulencia y marcadores de resistencia a fármacos. Con frecuencia, carecen de sensibilidad y de una cuantificación rentable del patógeno. Existe la necesidad en la técnica de dispositivos mejorados para la detección de ácidos nucleicos que superasen estas limitaciones al tiempo que también miniaturizasen y automatizasen la técnica, de modo que estos ensayos podrían aplicarse potencialmente en el punto de recogida de muestra con un entrenamiento mínimo.

25 La secuenciación de ácidos nucleicos está siendo cada vez más común en una diversidad de campos, tales como de secuenciación del genoma completo, diagnóstico, farmacogenómica y medicina forense. Sin embargo, el campo de la secuenciación se ha visto obstaculizado por la naturaleza costosa de las máquinas de secuenciación. El desarrollo de sistemas de ensayo de alto rendimiento económicos es críticamente importante para la generalización del ensayo genético y de las muchas ventajas que se asocian con el mismo. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas plataformas tecnológicas que permitan secuenciar de forma rápida y fiable ácidos nucleicos a un coste razonable. La invención descrita en el presente documento proporciona un sistema de secuenciación basado en gotas económico.

35 Los inmunoensayos se usan ampliamente para el diagnóstico clínico y constituyen un mercado de más de 3 mil millones de dólares en los Estados Unidos solamente. Los inmunoensayos están entre los procedimientos más sensibles y específicos que se usan rutinariamente en un laboratorio clínico. Los inmunoensayos hacen uso de la alta afinidad y especificidad en la unión entre un antígeno y su anticuerpo homólogo para detectar y cuantificar el antígeno en una matriz de muestra. Los inmunoensayos heterogéneos, tales como el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), están entre los procedimientos de análisis clínico más sensibles y específicos, y se han usado ampliamente para la identificación de una amplia clase de antígenos y anticuerpos. Por ejemplo, se realizan inmunoensayos, entre otras cosas, para la identificación de marcadores cardiacos, marcadores tumorales, fármacos, hormonas y enfermedades infecciosas.

45 El menor consumo de muestras, la mayor rapidez de análisis y la automatización completa son tres características altamente deseables que requieren una mejora continua de cualquier analizador clínico. Aunque los analizadores de inmunoensayo de laboratorio del estado de la técnica ofrecen una buena automatización y rendimiento, requieren una cantidad de muestra significativa por ensayo (incluyendo volúmenes no utilizables) y tiempos de análisis prolongados. Los largos tiempos de ensayo y el gran tamaño de estos analizadores los hace poco prácticos para su uso en un entorno de punto de recogida de muestra.

50 Además, existe una variabilidad considerable en el rendimiento de inmunoensayo, en gran parte atribuido a que las técnicas dependen del operario, dando como resultado que sea difícil comparar resultados de un estudio a otro, e incluso dentro del mismo estudio si se usa más de un laboratorio. Un analizador totalmente automático e integrado que elimine la dependencia del operario y normalice los resultados para los ensayos de control inmune mejoraría considerablemente la interpretación de los resultados de los ensayos.

55 Aunque se han realizado avances significativos en la automatización de inmunoensayos, estos analizadores son prohibitivamente caros y un entorno de investigación de bajo rendimiento no puede permitírseles. Los sistemas de bajas prestaciones con lavadores de placas automáticos, incubadoras y

óptica integrada requieren todavía que un técnico experto realice varias etapas clave en un inmunoensayo, tales como preparar placas de microtitulación con anticuerpos y cargar muestras en las placas. Esto da como resultado errores humanos debido a la intervención manual repetida, y es una fuente muy importante de variación interensayo e intraensayo.

5 También existe la necesidad de ensayos en el punto de recogida de muestra en una diversidad de campos, tales como los campos de detección relacionados con la medicina, el medio ambiente y el bioterrorismo. Como ejemplo, el ensayo en el punto de recogida de muestra (PRM) para análisis de sangre clínicos ha mejorado, pero continúa siendo un desafío clave para la atención médica moderna. Idealmente, el ensayo en PRM permitiría al médico clínico diagnosticar y aplicar tecnologías salvavidas a tiempo real, evitando la necesidad de grandes instalaciones de laboratorio. Continúa existiendo la necesidad en la técnica de un laboratorio en un chip que permita un control simultáneo de gases, metabolitos, electrolitos, enzimas, ADN, proteína y células en sangre en bajos volúmenes de muestra en el PRM.

15 El control microfluidido de los fluidos es requisito esencial para un laboratorio en un chip de éxito. Los sistemas microfluididos pueden agruparse ampliamente en arquitecturas basadas en flujo continuo y en flujo discreto. Como sugiere el nombre, los sistemas de flujo continuo dependen del flujo continuo de líquidos en canales mientras que los sistemas de flujo discreto utilizan gotas de líquido dentro de canales o en una arquitectura sin canales. Una limitación común de los sistemas de flujo continuo es que el transporte de líquido está físicamente confinado a canales permanentemente fijos. Los mecanismos de transporte usados están habitualmente impulsados por presión mediante bombas externas o impulsados electrocinéticamente mediante altos voltajes. Estas estrategias implican una canalización compleja y requieren grandes sistemas de soporte en forma de válvulas externas o suministros de energía. Estas restricciones hacen difícil conseguir un alto grado de integración funcional y control en sistemas de flujo continuo convencionales, particularmente en la realización de un dispositivo de mano en el punto de recogida de muestra. Continúa existiendo la necesidad en la técnica de un sistema de ensayo de punto de recogida de muestra que haga uso de manipulaciones de gotas y, especialmente, un sistema que pueda efectuar múltiples ensayos o múltiples tipos de ensayos en un solo microchip.

### 3 Breve Descripción de la Invención

30 Un aspecto de la presente invención se refiere a un lavado basado en gotas. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una modificación de superficie y un lavado basados en gotas. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para proporcionar una gota en contacto con la superficie de una o más perlas magnéticamente sensibles comprendidas en la gota en un microaccionador de gotas, comprendiendo la gota una concentración de partida y una cantidad de partida de una sustancia y teniendo un volumen de partida, con una concentración reducida de la sustancia, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar un microaccionador de gotas que comprende la superficie en contacto con la gota; y
- (b) realizar una o más operaciones de gotas para unir una gota de lavado con la gota proporcionada en la etapa (a), para dar una gota combinada;

**caracterizado porque** dicho procedimiento incluye además las etapas de:

- 40 (c) inmovilizar las perlas magnéticamente sensibles por exposición de las perlas magnéticamente sensibles a un campo magnético; y
- (d) realizar una o más operaciones de gotas mediadas por electrohumectación para dividir la gota combinada para dar un conjunto de gotas que comprenden:
  - 45 (i) una gota en contacto con la superficie que tiene una concentración disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida; y
  - (ii) una gota que está separada de la superficie.

50 En una realización, el procedimiento comprende además liberar o resuspender una o más de las perlas después de la etapa (d). En una realización alternativa, la etapa (c) comprende situar la gota que comprende las perlas magnéticamente sensibles en proximidad a un medio para lograr un campo magnético en proximidad a uno o más electrodos, en el que la intensidad y la proximidad del campo magnético son suficientes para inmovilizar magnéticamente perlas sensibles durante la ejecución de un protocolo de lavado.

En una realización alternativa adicional, la etapa (d) produce un conjunto de gotas que

comprenden:

- (a) una gota que comprende substancialmente todas las perlas y que tiene una concentración disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida; y
- (b) una gota que carece sustancialmente de las perlas.

5 El realizaciones preferidas adicionales, la gota de la etapa (d)(i) comprende más del 99%, más preferentemente más del 99,999%, de las perlas presentes en la gota combinada.

#### 4 Definiciones

Como se usan en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados indicados.

10 El término "activar", en referencia a uno o más electrodos, se refiere a efectuar un cambio en el estado eléctrico de uno o más electrodos que de como resultado una operación de gotas.

La "afinidad" significa a la atracción intramolecular específica o inespecífica de una molécula por otra molécula o por un sustrato, tal como la atracción de un anticuerpo por su antígeno o hapteno correspondiente.

15 El "analito" significa a una sustancia diana para la detección que puede estar presente en una muestra. Los ejemplos ilustrativos incluyen sustancias antigénicas, haptenos, anticuerpos, proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, fármacos, iones, sales, moléculas pequeñas, células.

20 El "anticuerpo" significa a un polipéptido que tiene afinidad por un epítipo o hapteno. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo y/o una molécula obtenida por ingeniería genética capaz de unirse al elemento correspondiente de un par de unión específico. Los anticuerpos pueden marcarse o conjugarse de otro modo con moléculas que faciliten la detección directa o indirecta de y/o la cuantificación del anticuerpo.

25 El término "perla", con respecto a perlas en un microaccionador de gotas, significa a cualquier perla o partícula capaz de interactuar con una gota en o en proximidad a un microaccionador de gotas. Las perlas pueden tener cualquiera de una amplia diversidad de formas, tales como esférica, esférica en general, en forma de huevo, en forma de disco, cúbica u otras formas tridimensionales. Por ejemplo, la perla puede ser capaz de transportarse en una gota en un microaccionador de gotas; configurada con respecto a un microaccionador de gotas de una forma que permita que una gota en el microaccionador de gotas se ponga en contacto con la perla, en el microaccionador de gotas y/o fuera del microaccionador de gotas. Pueden fabricarse perlas usando una amplia diversidad de materiales, incluyendo, por ejemplo, resinas y polímeros. Las perlas pueden ser de cualquier tamaño adecuado, incluyendo, por ejemplo, micropérlas, micropartículas, nanopérlas y nanopartículas. En algunos casos, las perlas son magnéticamente sensibles; en otros casos, las perlas no son significativamente magnéticamente sensibles. Para perlas magnéticamente sensibles, el material magnéticamente sensible puede constituir substancialmente toda la perla o sólo un componente de una perla. El resto de la perla puede incluir, entre otras cosas, material polimérico, revestimientos y restos que permitan la unión de un reactivo de ensayo. Se describen ejemplos de perlas magnéticamente sensibles adecuadas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2005-0260686, "Multiplex flow assays preferably with magnetic particles as solid phase", publicada el 24 de noviembre de 2005, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia respecto a sus enseñanzas en relación con materiales magnéticamente sensibles y perlas.

45 El término "dNTP" significa a un desoxinucleótido trifosfato, en el que el nucleótido es cualquier nucleótido, tal como A, T, C, G o U. El término "ddNTP" se refiere a un didesoxinucleótido trifosfato, en el que el nucleótido es cualquier nucleótido, tal como A, T, C, G o U. Se apreciará que a menos que se indique específicamente otra cosa, un ddNTP puede sustituirse por dNTP y viceversa.

50 El término "gota" significa a un volumen de líquido en un microaccionador de gotas que está al menos parcialmente limitado por fluido de carga. Por ejemplo, una gota puede estar completamente rodeada por fluido de carga o puede estar limitada por fluido de carga y una o más superficies del microaccionador de gotas. Las gotas pueden adoptar una amplia diversidad de formas; los ejemplos no limitantes incluyen generalmente en forma de disco, en forma de lingote, de esfera truncada, elipsoide, esférica, de esfera parcialmente comprimida, hemisférica, ovoide, cilíndrica y diversas formas formadas durante las operaciones de gotas, tales como unión o escisión, o formadas como resultado del contacto de dichas formas con una o más superficies de un microaccionador de gotas.

La expresión "operación de gotas" significa a cualquier manipulación de una gota en un microaccionador de gotas. Una operación de gotas puede incluir, por ejemplo: cargar una gota en el microaccionador de gotas; dispensar una o más gotas a partir de una gota fuente; escindir, separar o dividir una gota en dos o más gotas; transportar una gota desde una localización a otra en cualquier dirección; unir o combinar dos o más gotas en una sola gota; diluir una gota; mezclar una gota; agitar una gota; deformar una gota; retener una gota en su posición; incubar una gota; calentar una gota; vaporizar una gota; enfriar una gota; deshacerse de una gota; transportar una gota fuera de un microaccionador de gotas; otras operaciones de gotas descritas en el presente documento; y/o cualquier combinación de las anteriores. Los términos "unir", "que une", "combinar", "que combina" y similares se usan para describir la creación de una gota a partir de dos o más gotas. Debería entenderse que cuando se usa un término de este tipo en referencia a dos o más gotas, puede usarse cualquier combinación de operaciones de gotas suficiente para dar como resultado la combinación de las dos o más gotas en una gota. Por ejemplo, la "unión de la gota A con la gota B" puede conseguirse por transporte de una gota A en contacto con una gota B estacionaria, transporte de una gota B en contacto con una gota A estacionaria, o transporte de las gotas A y B en contacto entre sí. Los términos "escindir", "separar" y "dividir" no pretenden implicar ningún resultado particular con respecto al tamaño de las gotas resultantes (es decir, el tamaño de las gotas resultantes puede ser igual o diferente) o al número de gotas resultantes (el número de gotas resultantes puede ser de 2, 3, 4, 5 o más). El término "mezclar" significa a operaciones de gotas que dan como resultado una distribución más homogénea de uno o más componentes dentro de una gota. Los ejemplos de operaciones de gotas de "carga" incluyen la carga por microdiálisis, la carga asistida por presión, la carga robotizada, la carga pasiva y la carga con pipeta.

La expresión "electrónicamente acoplado" se usa en el presente documento para indicar una relación eléctrica o de datos entre dos o más componentes o elementos. Como tal, el hecho de que se diga que un primer componente está electrónicamente acoplado a un segundo componente no pretende excluir la posibilidad de que puedan estar presentes componentes adicionales entre y/u operativamente asociados o engranados con el primer y segundo componentes. Además, los componentes eléctricamente acoplados pueden incluir en algunas realizaciones componentes intermedios inalámbricos.

La expresión "magnéticamente sensible" significa sensible a un campo magnético. Los ejemplos de materiales magnéticamente sensibles incluyen materiales paramagnéticos, materiales ferromagnéticos, materiales ferrimagnéticos y materiales metamagnéticos. Los ejemplos de materiales paramagnéticos adecuados incluyen hierro, níquel y cobalto, así como óxidos metálicos, tales como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ,  $\text{CoO}$ ,  $\text{NiO}$ ,  $\text{Mn}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y  $\text{CoMnP}$ .

El término "protocolo" significa a una serie de etapas que incluyen, pero sin limitación, operaciones de gotas en uno o más microaccionadores de gotas.

El término "superficie", con relación a la inmovilización de una molécula, tal como un anticuerpo o analito, en la superficie, significa a cualquier superficie sobre la que puede inmovilizarse la molécula conservando al mismo tiempo la capacidad para interactuar con gotas en un microaccionador de gotas. Por ejemplo, la superficie puede ser una superficie en el microaccionador de gotas, tal como una superficie en la placa superior o placa inferior del microaccionador de gotas; una superficie que se extienda desde la placa superior o placa inferior del microaccionador de gotas; una superficie en un objeto físico situado en el microaccionador de gotas de una forma que le permita interactuar con gotas en el microaccionador de gotas; y/o una perla situada en el microaccionador de gotas, por ejemplo, en una gota y/o en un microaccionador de gotas, pero exterior a la gota.

El término "lavar", con respecto al lavado de una superficie, significa a reducir la cantidad de una o más sustancias en contacto con la superficie o expuestas a la superficie de una gota en contacto con la superficie. La reducción de la cantidad de la sustancia puede ser parcial, sustancialmente completa o incluso completa. La sustancia puede ser cualquiera de una amplia diversidad de sustancias; los ejemplos incluyen sustancias diana para su análisis posterior y sustancias no deseadas, tales como componentes de una muestra, contaminantes y/o reactivos en exceso. La superficie puede ser, por ejemplo, una superficie de un microaccionador de gotas o una superficie de una perla en un microaccionador de gotas. En algunas realizaciones, una operación de lavado comienza con una gota de partida en contacto con una superficie, en la que la gota incluye una cantidad total inicial de una sustancia. La operación de lavado puede desarrollarse usando una diversidad de operaciones de gotas. La operación de lavado puede producir una gota en contacto con la superficie, en la que la gota tiene una cantidad total de la sustancia que es inferior a la cantidad inicial de la sustancia. En otra realización, la operación de gotas puede producir la superficie en ausencia de una gota, en la que la cantidad total de la sustancia en contacto con la superficie o expuesta de otro modo a la superficie es inferior a la cantidad inicial de la sustancia en contacto con la superficie o expuesta a la superficie en la gota de partida. Se describen otras realizaciones en otra parte en el presente documento, y otras más serán inmediatamente evidentes en vista de la

presente divulgación.

5 Cuando se hace referencia a un componente dado en el presente documento, tal como una capa, región o sustrato, como dispuesto o formado "sobre" otro componente, ese componente dado puede estar directamente sobre el otro componente o, como alternativamente, también pueden estar presentes componentes intermedios (por ejemplo, uno o más revestimientos, capas, intercapas, electrodos o contactos). Se entenderá además que las expresiones "dispuesto sobre" y "formado sobre" se usan indistintamente para describir cómo un compuesto dado se sitúa o coloca en relación a otro componente. Por lo tanto, las expresiones "dispuesto sobre" y "formado sobre" no pretenden introducir ninguna limitación en relación con procedimientos particulares de transporte, deposición o fabricación de material.

10 Cuando se describe que un líquido en cualquier forma (por ejemplo, una gota o un cuerpo continuo, ya sea en movimiento o estacionario) está "sobre", "en" o "por encima de" un electrodo, serie, matriz o en superficie, dicho líquido podría estar en contacto directo con el electrodo/serie/matriz/superficie o podría estar en contacto con una o más capas o películas que estén interpuestas entre el líquido y el electrodo/serie/matriz/superficie.

15 Cuando se describe que una gota está "sobre" o "cargada sobre" un microaccionador de gota, debería entenderse que la gota está dispuesta sobre el microaccionador de gotas de forma que facilite el uso del microaccionador de gotas para realizar operaciones de gotas en la gota, la gota está dispuesta sobre el microaccionador de gotas de forma que facilite la detección de una propiedad de o una señal de la gota, y/o la gota se ha sometido a una operación de gotas en el microaccionador de gotas.

## 20 5 Breve Descripción de los Dibujos

Las Figuras 1 y 2 son ilustraciones que muestran etapas de reacción y operaciones de gotas de una realización ilustrativa de acuerdo con la presente invención;

la Figura 3 es una vista en perspectiva de un microaccionador de gotas para su uso en la realización de inmunoensayos de acuerdo con una realización de la presente invención;

25 la Figura 4 es una ilustración que muestra etapas para realizar un ensayo basado en afinidad de tipo sándwich basado en gotas realizado en un microaccionador de gotas de acuerdo con una realización de la presente invención;

30 la Figura 5 es una ilustración que muestra etapas para realizar un ensayo basado en afinidad competitivo realizado en un microaccionador de gotas de acuerdo con una realización de la presente invención;

las Figuras 6-8 son ilustraciones que muestran etapas para inmovilizar y liberar perlas magnéticamente sensibles usando un campo magnético de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención;

35 la Figura 9 es una ilustración de sistemas microaccionadores de gotas de acuerdo con una realización de la presente invención;

las Figuras 10A y 10B son ilustraciones de un analizador de mano portátil de acuerdo con una realización de la presente invención;

## 6 Descripción Detallada de la Invención

40 La invención proporciona procedimientos, dispositivos y sistemas para ejecutar uno o más ensayos bioquímicos basados en gotas. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos, dispositivos y sistemas para amplificar ácidos nucleicos, analizar las secuencias de ácidos nucleicos, realizar ensayos basados en afinidad y/o analizar componentes de fluidos corporales.

45 En ciertas realizaciones, un protocolo del sistema puede implicar una o más de las etapas siguientes en cualquier orden que consiga el propósito de detección de la invención: extraer una muestra de un sujeto; procesar la muestra para la carga en un microaccionador de gotas; cargar la muestra en el microaccionador de gotas; dispensar una o más gotas de muestra de la muestra para su transporte en el microaccionador de gotas; cargar uno o más reactivos en el microaccionador de gotas; dispensar una o más gotas de reactivo para su transporte en el microaccionador de gotas; transportar una o más gotas de reactivo y/o una o más gotas de muestra para poner la una o más gotas de reactivo en contacto con la una o más gotas de muestra, logrando de este modo la interacción del reactivo con la muestra; detectar un efecto de la interacción del reactivo con la muestra; proporcionar un resultado que notifique al usuario los resultados de la etapa de detección. Se analizan ejemplos de protocolos bioquímicos para su uso con un microaccionador de gotas de la invención en las secciones subsiguientes.

## 6.1 Amplificación de Ácido Nucleico

La invención proporciona procedimientos, dispositivos y sistemas para la amplificación de ácidos nucleicos en gotas en un microaccionador de gotas. Puede generarse un gran número de copias de una o más moléculas de ácido nucleico en una sola gota a partir de un pequeño número de copias o incluso una sola copia presente en la gota. Los procedimientos de la invención implican generalmente combinar los reactivos necesarios para formar una gota lista para su amplificación y el termociclado de la gota a temperaturas suficientes para dar como resultado la amplificación de un ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En algunas realizaciones, una gota que incluye el ácido nucleico diana amplificado puede transportarse después a un procedimiento posterior, tal como un procedimiento de detección, un procedimiento para la manipulación adicional del ácido nucleico diana y/o un procedimiento de secuenciación. Los dispositivos de amplificación pueden incluir un microaccionador de gotas y componentes suficientes para realizar operaciones de gotas que afecten a los procedimientos de la invención cuando el microaccionador de gotas se carga con reactivos apropiados. Los sistemas de la invención pueden incluir el microaccionador de gotas más componentes de sistema diseñados para facilitar el control por software del funcionamiento del microaccionador de gotas para ejecutar protocolos de la invención.

En una realización, la invención proporciona un microaccionador de gotas y/o un sistema configurado y programado para efectuar la amplificación de una muestra en una gota lista para su amplificación, seguida de la captura del ácido nucleico amplificado. El ácido nucleico amplificado puede tratarse para desnaturalizarlo en ácido nucleico monocatenario antes o después de que se ponga en contacto con perlas magnéticamente sensibles para permitir que el ácido nucleico monocatenario se una a las perlas magnéticamente sensibles. La unión, por ejemplo, puede lograrse usando un sistema de biotina-estreptavidina, por ejemplo, en el que el ácido nucleico monocatenario está biotinilado y la superficie (por ejemplo, perlas o superficie de un microaccionador de gotas) está revestida con estreptavidina unida covalentemente a la misma. Los reactivos de amplificación pueden eliminarse por lavado usando un protocolo de lavado. Diversos otros procedimientos, dispositivos, sistemas y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la discusión subsiguiente.

### 6.1.1 Muestras y Preparación de Muestras

Los procedimientos de amplificación de la invención hacen uso de una muestra que incluye un molde de ácido nucleico para su amplificación. El molde de ácido nucleico puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, ADN genómico, ARN, plásmidos, bacteriófagos y/o secuencias artificiales. El molde de ácido nucleico puede ser de cualquier fuente, por ejemplo, organismos completos, órganos, tejidos, células, orgánulos (por ejemplo, cloroplastos, mitocondrias), fuentes de ácidos nucleicos sintéticos, etc.. Además, los moldes pueden tener una amplia diversidad de orígenes, por ejemplo, muestras patológicas, muestras forenses, muestras arqueológicas, etc. Las muestras biológicas pueden incluir, por ejemplo, sangre completa, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrimas, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, líquido seminal, excreciones vaginales, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido quístico, bilis, orina, fluidos gástricos, fluidos intestinales, muestras fecales e hisopos o lavados (por ejemplo, orales, nasofaríngeos, ópticos, rectales, intestinales, vaginales, epidérmicos, etc.) y/u otras muestras biológicas.

Pueden efectuarse diversas etapas de procesamiento de muestras para preparar el molde de ácido nucleico. En algunos casos, tales como la amplificación a partir de plásmidos o bacteriófagos, será suficiente muestra bruta. En otros casos, tales como la amplificación de grandes fragmentos a partir de ADN genómico, se prefiere molde altamente purificado. Las etapas de preparación de muestra pueden tener lugar en o fuera del microaccionador de gotas.

El sistema de la invención puede configurarse y programarse para permitir el procesamiento de una muestra biológica para preparar una gota que incluye un molde de ácido nucleico para su amplificación. Alguna o todas las partes de este procesamiento pueden efectuarse en o fuera del microaccionador de gotas, por ejemplo, usando perlas que tienen reactivos unidos a las mismas con afinidad por organismos diana para aislar los organismos diana a partir de una muestra biológica. El microaccionador de gotas puede procesar la muestra dividiéndola en una o más gotas separadas para operaciones posteriores en el microaccionador de gotas.

Las muestras pueden, en algunos casos, tratarse para cambiar reduciendo la viscosidad durante las operaciones de gotas posteriores. Por ejemplo, pueden prepararse muestras en el microaccionador de gotas o fuera del microaccionador de gotas por mezcla con una solución alcalina (por ejemplo, KOH al 10%) o agentes reductores tales como ditiotreitól (DTT) o ditioeritritól (DTE) para licuar la muestra y hacerla lo suficientemente fluida para favorecer las operaciones de gotas en un microaccionador de gotas. Otros ejemplos de técnicas de preparación de muestra adecuada se describen en la Solicitud de Patente

de Estados Unidos 60/745.950, titulada "Apparatus and Methods of Sample Preparation for a Droplet Microactuator", presentada el 28 de abril de 2006.

Una gota que incluye el molde de ácido nucleico puede combinarse con reactivos de amplificación para proporcionar una gota lista para su amplificación, por ejemplo, combinada con reactivos de PCR para dar una gota lista para PCR. Dependiendo de los reactivos seleccionados, la gota lista para su amplificación puede amplificarse isotérmicamente o termociclarse para lograr la amplificación de un ácido nucleico diana. El producto amplificado puede detectarse y/o cuantificarse a tiempo real en un microaccionador de gotas. De esta forma, la invención proporciona una amplificación cuantitativa a tiempo real en un chip para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra.

#### 10 6.1.1.1 Cebadores

Los reactivos usados en los procedimientos de amplificación de la invención incluirán uno o más cebadores. En procedimientos típicos, se usan dos cebadores para definir la región del molde de ácido nucleico que se amplificará.

15 Los cebadores también pueden marcarse. Por ejemplo, pueden seleccionarse marcadores que faciliten la detección, localización, cuantificación y/o aislamiento del producto de PCR. Por ejemplo, puede usarse la biotilación para facilitar la detección y/o purificación usando estreptavidina para capturar el producto de PCR biotilado en la superficie. Además, la estreptavidina puede asociarse con perlas magnéticamente sensibles para la captura del producto de PCR biotilado.

#### 20 6.1.2 Protocolos de Amplificación

En una realización, una PCR basada en gotas puede ejecutarse en un microaccionador de gotas para cuantificar los cambios en los niveles de expresión génica para biomarcadores de cáncer pertinentes, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina p21 (Cip1) y p27 (Kip1). Por ejemplo, las células en una gota, ya estén suspendidas o unidas a una superficie, pueden lisarse. Puede capturarse el ARNm poli(A) liberado en gotas usando perlas, tales como perlas con oligo (dT) magnéticamente sensibles. Los reactivos están disponibles de Dynal Biotech en su Micro Kit de ARNm DIRECT. La mezcla o agitación de gotas puede usarse para aumentar la lisis celular y aumentar la captura de ARNm poli(A) sobre las perlas. El ARNm de perlas con oligo (dT) magnéticamente sensibles puede eluirse por fusión térmica del dúplex de ARN-ADN. La temperatura apropiada depende de la longitud de la cadena. Las perlas pueden lavarse usando protocolos de lavado basados en gotas como se describe en otra parte en el presente documento. Puede realizarse una PCR (por ejemplo, qRT-PCR) usando un protocolo basado en gotas en el microaccionador de gotas con los cebadores apropiados para las dianas génicas (por ejemplo, VEGF, p21 (Cip1) y p27 (Kip1)). La amplificación de ARN basada en gotas también puede lograrse usando la técnica de Van Gelder y Eberwine.

### 35 6.2 Análisis de Secuencias de Ácidos Nucleicos

La invención proporciona procedimientos, dispositivos y sistemas para análisis de secuencias de ácidos nucleicos basados en gotas en un sistema microaccionador de gotas que, entre otras cosas, evita los problemas asociados con las mezclas cada vez más complejas requeridas por las estrategias de la técnica anterior.

#### 40 6.2.1 Inmovilización de Ácido Nucleico

Una muestra de ácido nucleico amplificada puede inmovilizarse dentro del microaccionador de gotas de modo que las gotas de reactivo puedan ponerse en contacto con el ácido nucleico inmovilizado. La inmovilización puede ser sobre una superficie del microaccionador de gotas o sobre otras superficies dentro del microaccionador, tales como perlas hechas de polímeros, resinas poliméricas y que incluyen opcionalmente materiales magnéticamente sensibles.

Los sustratos útiles para dicha unión incluyen vidrio, oro, geles de poliacrilamida, polipirrol, teflón y fibras ópticas. Los materiales pueden proporcionarse, por ejemplo, como películas, partículas, matrices o perlas. En una realización, el sustrato incluye perlas magnéticamente sensibles. El microaccionador de gotas puede incluir un imán o electroimán para producir un campo magnético para manipular (por ejemplo, inmovilizar, liberar o mover) las perlas magnéticamente sensibles. Por ejemplo, las perlas magnéticamente sensibles pueden agitarse e inmovilizarse sobre el microaccionador usando un campo magnético para mejorar las etapas de lavado (véase la Sección 6.6).

Pueden usarse una amplia diversidad de técnicas para inmovilizar moléculas, tales como ADN, en superficies. Los ejemplos incluyen las químicas usadas para unir oligonucleótidos a la superficie de

micromatrices y las químicas usadas en técnicas de síntesis en fase sólida.

Las muestras de ácido nucleico pueden tiolarse y adsorberse a un sustrato de oro. Los ácidos nucleicos pueden tiolarse, por ejemplo, por sustitución de un oxígeno internucleotídico que esté formando un enlace de un resto fosfodiéster con azufre, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.472.881, por Beebe y col., titulada "Thiol Labeling of DNA for Attachment to Gold Surfaces", cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia. Una o más gotas que incluyen el ácido nucleico tiolado pueden transportarse sobre el microaccionador de gotas hasta una superficie de oro, en la que la muestra de ácido nucleico tiolada se depositará sobre la superficie de oro. La gota que incluye el ADN tiolado se pone en contacto con la superficie de oro durante un tiempo suficiente para que se formen enlaces covalentes entre el azufre y el oro. Pueden emplearse técnicas de electroaccionamiento para aumentar el área superficial de la gota con la superficie de oro.

Puede biotinilarse una muestra de ADN en los extremos 5' usando un éster de biotina soluble en agua o usando un reactivo de biotil fosforamida. El ADN biotinilado puede capturarse sobre sustratos revestidos con estreptavidina. Por lo tanto, una gota que incluye una muestra de ADN biotinilado puede transportarse en contacto con la superficie de estreptavidina en la que el ADN se capturará e inmovilizará.

Se han descritos químicas para la inmovilización de ADN monocatenario en un sustrato (S. Taira y col., "Immobilization of single-stranded DNA by self-assembled polymer on gold substrate for a DNA chip", *Biotechnol Bioeng.* 30 Mar 2005; 89(7):835-8). En esta estrategia, se une covalentemente ácido tiótico (TA) a poli(clorhidrato de allamina) (PAH) en cadenas laterales para inmovilizar el polímero sobre una superficie de oro por autoensamblaje. El ADN monocatenario (mc) de sonda terminado con éster de *N*-hidroxisuccinimida se inmoviliza covalentemente con facilidad sobre una superficie de oro revestida con TA-PAH. La superficie puede cubrirse con ácido poliacrílico, que forma complejos iónicos con el TA-PAH para reducir la carga catiónica.

Un aspecto de la invención es un microaccionador de gotas que tiene un sustrato para la inmovilización de un ácido nucleico. Otro aspecto es un microaccionador de gotas que incluye un sustrato para la inmovilización de un ácido nucleico y reactivos para inmovilizar el ácido nucleico en el sustrato. Otro aspecto más es un microaccionador de gotas que incluye un sustrato para la inmovilización de un ácido nucleico, reactivos para inmovilizar el ácido nucleico en el sustrato y una muestra de ácido nucleico. Estos reactivos y muestras pueden almacenarse, por ejemplo, en depósitos en el microaccionador de gotas y/o en depósitos u otros recipientes fuera del microaccionador de gotas (por ejemplo, en un cartucho). En una realización de un ensamblaje de carga de depósito, pueden acoplarse depósitos de reactivo y/o muestra (por ejemplo, en viales o jeringas) en comunicación fluida con depósitos de microaccionador de gotas, de modo que el fluido de los viales pueda fluir o forzarse a pasar directamente hacia los depósitos del microaccionador de gotas. Este aspecto de la invención puede aumentarse a escala, de modo que el número de depósitos y de ensamblajes de carga de depósito puede aumentarse según sea necesario para incluir ranuras para tantos reactivos como sea necesario para realizar un protocolo deseado.

### 6.2.2 Incorporación de Nucleótidos Facilitada por Polimerasa

Como se ilustra en las etapas 4 y 5 de la Figura 1, la muestra de nucleótido monocatenario inmovilizada se ceba para dar un segmento bicatenario. El cebado puede conseguirse, por ejemplo, mediante el transporte de una gota que comprende un cebador en contacto con la muestra inmovilizada.

La muestra cebada se hace reaccionar con un desoxinucleótido trifosfato (dNTP) en presencia de una polimerasa. La reacción puede conseguirse por transporte de una o más gotas que incluyen un desoxinucleótido trifosfato (dNTP) y una polimerasa en contacto con la muestra inmovilizada. Si el dNTP es complementario a la primera base en la porción monocatenaria de la muestra de ácido nucleico, la polimerasa cataliza su incorporación en la cadena de ADN. Cada acontecimiento de incorporación se acompaña de liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad correspondiente a la cantidad de nucleótido incorporado. Por lo tanto, los acontecimientos de incorporación pueden determinarse por medición del PPi liberado. La adición de dNTP se realiza típicamente de uno en uno, cada uno en un tampón separado. La incorporación de nucleótidos se desarrolla de forma secuencial a lo largo de cada molde inmovilizado ya que cada nucleótido se hace disponible en un orden preseleccionado o programado.

Pueden usarse una diversidad de polimerasas nativas y modificadas. Las polimerasas modificadas incluyen, por ejemplo, secuencias nativas con adiciones, inserciones o sustituciones que dan como resultado una polimerasa que conserva la capacidad de facilitar la incorporación de un nucleótido en una muestra cebada. La polimerasa puede ser una polimerasa deficiente en exonucleasa. También puede usarse el fragmento grande o Klenow de la ADN polimerasa.

Puede seleccionarse un análogo de dATP o ddATP que no interfiera en la reacción de detección enzimática de PPI pero que, no obstante, pueda incorporarse mediante una polimerasa en una cadena de ADN en crecimiento sin interferir con un emparejamiento de bases apropiado. Los ejemplos de análogos adecuados incluyen análogos de [1-tio]trifosfato (o  $\alpha$ -tiotrifosfato) de desoxi o dideoxi ATP, por ejemplo, [1-tio]trifosfato de desoxiadenosina o  $\alpha$ -tiotrifosfato de desoxiadenosina (dATP $\alpha$ S) como se conoce también. Estos y otros análogos se describen en la Patente de Estados Unidos 6.210.891, por Nyren y col., titulada "Method of sequencing DNA", cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia por su contenido en relación con dichos análogos.

Puede incluirse una proteína de unión monocatenaria que abarque la longitud de secuencias que pueden secuenciarse reduciendo el plegamiento de la muestra monocatenaria. Por lo tanto, por ejemplo, la invención incluye un microaccionador de gotas que incluye una gota que incluye una proteína de unión monocatenaria. La gota puede ser una gota lista para su amplificación que incluye una proteína de unión monocatenaria. La invención incluye procedimientos de realización de operaciones de gotas en una gota que incluye una proteína de unión monocatenaria.

### 6.2.3 Detección de la Incorporación de Nucleótidos

La determinación de si una base específica se ha incorporado en el sitio diana puede implicar la cuantificación del PPI liberado durante la reacción de incorporación. A medida que se añade cada dNTP a una cadena de ácido nucleico en crecimiento durante una reacción de polimerasa, se libera un PPI. El PPI liberado en estas condiciones puede detectarse enzimáticamente, por ejemplo, mediante la generación de luz en la reacción de luciferasa-luciferina (analizada adicionalmente a continuación). A medida que el procedimiento continúa, la cadena complementaria se ensambla y la secuencia de nucleótidos se determina a partir de los picos de señal. El sistema puede producir un programa, como se ilustra en la Figura 2.

### 6.2.4 Protocolos de Operaciones de Gotas

Se apreciará que, además de los protocolos descritos anteriormente, pueden utilizarse una diversidad de protocolos de operaciones de gotas para llevar a cabo los análisis de secuencia de la invención. Por lo tanto, por ejemplo, la conversión en ATP puede lograrse en una sola reacción junto con la reacción de incorporación de dNTP, o las reacciones pueden realizarse por etapas: (1) incorporación de dNTP para liberar PPI, seguida de (2) conversión de PPI en ATP. Cuando las etapas de incorporación y conversión se realizan juntas, el sistema puede transportar una sola gota que incluye los reactivos necesarios (dNTP, polimerasa, ATP sulfurilasa y APS). Por lo tanto, todos los reactivos necesarios para incorporar un dNTP en la muestra inmovilizada, liberar PPI y hacer reaccionar el PPI con APS para dar ATP pueden incluirse en un depósito en el microaccionador de gotas como un solo reactivo de fuente para cada nucleótido. El reactivo de fuente para cada nucleótido puede ponerse en contacto sucesivamente con la muestra inmovilizada de modo que puedan tener lugar las reacciones, produciendo ATP en presencia de un dNTP complementario.

Cuando las etapas de incorporación y conversión se realizan por separado, el cebador, la polimerasa, el dNTP, la sulfurilasa y el APS pueden proporcionarse a partir de fuentes separadas como gotas de reactivo separadas que se unen entre sí para realizar las reacciones de la invención. Como alternativa, algunos o todos estos reactivos pueden proporcionarse a partir de una sola fuente como una gota de reactivo de pirosecuenciación que se pone en contacto con la muestra inmovilizada para realizar las reacciones de la invención. Por ejemplo, una gota que incluye el dNTP y la polimerasa puede ponerse en contacto con la muestra inmovilizada, de modo que en la base se incorporará si es complementaria, liberando de este modo PPI. La gota que incluye potencialmente el PPI puede transportarse después lejos de la muestra inmovilizada y combinarse con una gota que incluye la ATP sulfurilasa y el APS para producir ATP. Como alternativa, una gota que incluye la ATP sulfurilasa y el APS puede combinarse con la gota que incluye potencialmente el PPI en presencia de la muestra inmovilizada para producir ATP.

Además, aunque la Figura 1 ilustra la etapa de cebado 4 y las etapas de incorporación/conversión 5 como si ocurriesen secuencialmente, se apreciará que pueden separarse más o que pueden incorporarse todas en una sola etapa. En otras palabras, cada reactivo específico puede añadirse a la reacción en el momento apropiado en una o más gotas o cualquier combinación de múltiples reactivos pueden proporcionarse juntos en una sola gota o serie de gotas. Por lo tanto, en una realización, el microaccionador de gotas transporta una o más gotas en contacto con la muestra monocatenaria, en la que una o más gotas juntas incluyen los reactivos siguientes (o sus equivalentes funcionales) proporcionados juntos o en gotas separadas: cebador, polimerasa y dNTP en cualquier combinación y en cualquier orden, produciendo el resultado de que el cebador hibride con la muestra para formar una porción bicatenaria, la polimerasa catalice la incorporación de cualquier dNTP complementario en un sitio diana en la primera posición de base monocatenaria adyacente a la porción bicatenaria, liberando de este

modo PPI.

En otra realización, el microaccionador de gotas transporta una o más gotas en contacto con la muestra monocatenaria y la una o más gotas juntas incluyen los reactivos siguientes (o sus equivalentes funcionales): cebador, polimerasa, dNTP, sulfurilasa y APS, en cualquier combinación o en cualquier orden, produciendo el resultado de que el cebador hibride con la muestra para formar una porción bicatenaria, la polimerasa catalice la incorporación de cualquier dNTP complementario en un sitio diana en la primera posición de base monocatenaria adyacente a la porción bicatenaria, liberando de este modo PPI, y la ATP sulfurilasa convierta cualquier PPI en ATP en presencia de APS. La incorporación de bases se determina por cuantificación de la cantidad de PPI liberado.

La gota que comprende potencialmente ATP puede unirse por técnicas de microaccionamiento de gotas con una gota que comprende reactivos, tales como luciferasa y luciferina, para facilitar la detección de cualquier ATP. De forma similar, una gota que incluye luciferina y que comprende potencialmente ATP puede unirse por técnicas de microaccionamiento de gotas con una gota que incluye luciferasa para la detección de cualquier ATP. Además, una gota que incluye luciferina y que comprende potencialmente ATP puede unirse por técnicas de microaccionamiento de gotas con una gota que incluye luciferina para detección de cualquier ATP.

Las gotas para la reacción de detección pueden unirse en presencia de o separadas de la muestra inmovilizada. Por ejemplo, una gota de luciferasa/luciferina puede unirse con la gota que incluye potencialmente ATP en presencia de la muestra inmovilizada. Como alternativa, la gota que incluye potencialmente ATP puede separarse de la muestra inmovilizada que se unirá con una gota de luciferasa/luciferina. En cualquier caso, la unión de gotas que incluyen reactivos que producen una señal luminosa puede lograrse en proximidad al sensor para maximizar la cantidad de luz detectada.

Cuando la gota que incluye potencialmente ATP se transporta lejos de la muestra inmovilizada que se unirá con una gota de luciferasa, la etapa de transporte puede incluir una etapa de incubación para maximizar la producción de ATP para la detección en la reacción de fluorescencia. En otras palabras, esta incubación puede efectuarse durante el transporte, o la gota puede almacenarse temporalmente para su incubación antes de la reacción de fluorescencia. El microaccionador de gotas puede incluir una zona de incubación con este fin. La zona de incubación puede o no incluir un elemento de calentamiento para controlar la temperatura en la zona. La zona de incubación puede o no incluir una pared que separe la zona del resto del microaccionador de gotas. La zona de incubación puede incluir una matriz de electrodos para facilitar el transporte de gotas hacia y fuera de la zona. La zona puede aumentarse a escala y puede incluir electrodos para transportar y almacenar decenas, cientos o más gotas dentro de la zona de incubación.

En la práctica de la invención, uno o más reactivos de detección pueden excluirse específicamente de la etapa de reacción de polimerasa de modo que no se emitirá cualquier señal durante la reacción de polimerasa. Por ejemplo, en una realización, no se añade una enzima de detección a la mezcla de detección para la etapa de polimerasa. En su lugar, la gota usada para realizar la etapa de polimerasa se transporta lejos de la muestra inmovilizada, después se une con una gota que incluye la enzima de detección en el rango de un sensor para detectar la señal de cualquier reacción resultante.

La mezcla de reacción para la reacción de polimerasa puede incluir por lo tanto al menos un dNTP, una polimerasa, un APS y una ATP sulfurilasa, y puede incluir opcionalmente luciferina, careciendo al mismo tiempo de cualquier cantidad significativa de luciferasa. De esta forma, la reacción de incorporación de dNTP puede separarse de la reacción de detección. La reacción de detección puede realizarse por lo tanto en presencia del sensor, por ejemplo, como se ilustra en la Figura 2, para maximizar la señal de detección. Por ejemplo, cuando la señal de detección incluye luz, la reacción de detección puede completarse en el rango de un sensor para detectar la luz emitida a partir de cualquier reacción productora de luz resultante.

Además, una reacción de detección y una reacción de incorporación posterior pueden realizarse en paralelo, acelerando de este modo la velocidad de secuenciación. De forma similar, puede realizarse una reacción de incorporación, el resultado de una reacción de incorporación previa puede incubarse, y el resultado de una incubación previa puede someterse a detección todo en paralelo en gotas separadas, acelerando de este modo la velocidad de secuenciación.

A diferencia de ciertos procedimientos de la técnica anterior, la estrategia de microaccionador de gotas de la presente invención evita efectos de transporte de masas. Los reactivos pueden ponerse directamente en contacto con cada muestra, sin requerir un flujo de reactivos a través de múltiples muestras. Cuando se usan perlas magnéticamente sensibles, pueden mantenerse en su lugar usando un campo magnético y/o pueden transportarse de un sitio a otro en gotas. Los reactivos pueden transportarse

5 desde una fuente de reactivo directamente hasta una muestra sin entrar en contacto con otras muestras y causar potencialmente contaminación cruzada. La difusión de subproductos se evita por aislamiento de gotas en el fluido de carga. Los pocillos llenos de perlas, por ejemplo, perlas estabilizantes, que pueden interferir con la detección de luz, también pueden evitarse. Un lavado que contiene apirasa puede usarse entre aplicaciones de nucleótidos, pero su uso no es necesario en la práctica de la invención y, en algunas realizaciones, se evita específicamente.

Entre aplicaciones de cada nuevo conjunto de reactivos a la muestra inmovilizada, puede lavarse, por ejemplo, con una solución de tampón. Se describen diversos protocolos de lavado de superficies en la Sección 6.6.

## 10 6.3 Ensayos Basados en Afinidad

15 La invención proporciona procedimientos, dispositivos y sistemas para realizar ensayos basados en afinidad basados en gotas, tales como ensayos basados en afinidad. Estos ensayos incluyen cualquier ensayo en el que un compuesto que tiene una afinidad de unión por un analito se pone en contacto en el analito o con una muestra que incluye potencialmente el analito usando operaciones de gotas. Por ejemplo, el compuesto que tiene una afinidad de unión por un analito puede proporcionarse en una gota y transportarse en contacto con un analito que esté presente en otra gota en un microaccionador de gotas, o que esté inmovilizado en una superficie de un microaccionador de gotas. Como otro ejemplo, el compuesto que tiene afinidad de unión por el analito puede inmovilizarse de por sí en la superficie de un microaccionador de gotas y/o en la superficie de perlas incluidas en un microaccionador de gotas, y una gota que incluye el analito o que incluye potencialmente el analito puede ponerse en contacto con el anticuerpo inmovilizado.

25 Se apreciará que son posibles una amplia diversidad de protocolos de ensayo basados en afinidad dentro del ámbito de la invención. Los ejemplos de formatos de ensayo basados en afinidad incluyen ensayos basados en afinidad directos, ensayos basados en afinidad indirectos y ensayos basados en afinidad competitivos. Los ensayos pueden emplearse para detectar la presencia de un analito diana y también pueden usarse en algunos casos para cuantificar el analito diana presente en una muestra. En un ensayo competitivo, una gota que incluye un anticuerpo de muestra y un anticuerpo marcado se pone en contacto con una superficie. El anticuerpo de la muestra compete con el anticuerpo marcado por su unión a un antígeno adsorbido sobre la superficie. Una variante de esta estrategia implica unir el antígeno a la superficie mediante un engarce intermedio. Por ejemplo, el engarce puede ser un anticuerpo. El ensayo de puente de captura usa una gota que incluye un anticuerpo de muestra para unir el antígeno adsorbido a la superficie con antígeno en solución. Otra estrategia implica el uso de antígeno biotinilado y una fase sólida revestida con estreptavidina. Otra estrategia implica la unión del anticuerpo de muestra a antígeno inmovilizado sobre la fase sólida. El anticuerpo unido puede detectarse con un segundo anticuerpo marcado específico de isotipo. El exceso de anticuerpo puede eliminarse por lavado usando los protocolos de gotas de la invención.

35 Se apreciará que un aspecto importante de la invención implica la capacidad para realizar operaciones de gotas usando cada uno de los reactivos y/o muestras de ensayos basados en afinidad necesarios en un microaccionador de gotas.

### 40 6.3.1 Muestras y Preparación de Muestras

45 La invención proporciona ensayos basados en afinidad basados en gotas que son útiles para la detección de una amplia diversidad de analitos. Por ejemplo, cualquier analito que pueda unirse con especificidad a una molécula de afinidad tal como un anticuerpo es adecuado para la detección usando los sistemas de la invención. Una sola muestra puede analizarse para uno o más analitos diana. Los analitos pueden ser, por ejemplo, analitos biológicos o analitos sintéticos. Los ejemplos incluyen analitos en las categorías siguientes: analitos de fuentes humanas, analitos de fuentes animales, analitos de fuentes vegetales, analitos de fuentes bacterianas, analitos de fuentes virales y analitos de fuentes de esporas. Los analitos pueden incluir, por ejemplo, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas y diversas biomoléculas, tales como carbohidratos, lípidos y similares. Una realización, las muestras se ponen en contacto con anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, anticuerpo inmovilizado sobre perlas), antes de la introducción del anticuerpo inmovilizado sobre el microaccionador de gotas.

55 Un microaccionador de gotas ilustrativo 600 adecuado para realizar inmunoensayos se ilustra en la Figura 3. Esta realización puede emplear dos sustratos, un primer sustrato 601a y un segundo sustrato 601b separados de una forma sustancialmente paralela para proporcionar un espacio intermedio. Pueden proporcionarse múltiples depósitos u orificios de fluido en el espacio intermedio, tales como depósitos de tampón de lavado 602, depósito de muestra 604, depósito de anticuerpo primario 606, depósito de anticuerpo secundario 608 y depósito de anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, anticuerpo inmovilizado

sobre perlas) 610. También pueden proporcionarse áreas de desecho 612, así como un imán 614 situado de forma que permita la interacción entre el campo magnético del imán y los componentes magnéticamente sensibles localizados en el espacio intermedio. En esta realización particular, se proporcionan electrodos de transporte 616 en el primer sustrato.

### 5 6.3.2 Ensayo Basado en Afinidad de Tipo Sándwich

En una realización, la invención proporciona un ensayo basado en afinidad de tipo sándwich basado en gotas realizado en un microaccionador de gotas. Se apreciará que son posibles una amplia diversidad de protocolos dentro del ámbito de la invención para realizar ensayos basados en afinidad de tipo sándwich. El siguiente protocolo basado en gotas, que se basa en la ilustración de la Figura 4, se proporciona como ejemplo solamente y no pretende limitar en el ámbito de la invención:

10

(1) inmovilizar en una superficie un anticuerpo (primario) con especificidad por un analito diana;

(2) lavar el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, usando un protocolo de lavado basado en gotas para eliminar el exceso de anticuerpo;

15

(3) usar operaciones de gotas para exponer el anticuerpo inmovilizado a una gota de muestra que incluye potencialmente el analito diana con afinidad de unión por el anticuerpo inmovilizado;

(4) lavar el complejo de anticuerpo inmovilizado-analito diana, por ejemplo, usando un protocolo de lavado basado en gotas para eliminar los componentes no unidos de la gota de muestra;

(5) exponer el anticuerpo inmovilizado (que incluye ahora potencialmente el analito diana unido al mismo) a una gota que incluye un anticuerpo indicador (secundario);

20

(6) eliminar por lavado el exceso de anticuerpo indicador, por ejemplo, usando un protocolo de lavado basado en gotas;

(7) opcionalmente, realizar etapas adicionales para proporcionar un parámetro o señal medible;

(8) medir el parámetro medible o señal; y

(9) proporcionar un resultado indicativo de la señal.

25

Una o más de cualquiera de las etapas anteriores pueden realizarse usando operaciones de gotas en un microaccionador de gotas como se describe en el presente documento.

#### 6.3.2.1 Inmovilización de Anticuerpo

30

Un anticuerpo primario se inmoviliza en una superficie. La superficie puede ser, por ejemplo, una superficie del microaccionador de gotas, o la superficie de perlas, tales como perlas magnéticamente sensibles, perlas no magnéticamente sensibles, o partículas, tales como nanopartículas.

35

La inmovilización del anticuerpo en la superficie puede efectuarse en el microaccionador de gotas usando protocolos basados en gotas. Por ejemplo, pueden introducirse reactivos para inmovilizar un anticuerpo en una superficie en el microaccionador de gotas, dispensarse como gotas separadas y transportarse en contacto con la superficie para su deposición. Cuando la superficie en cuestión es la superficie de una o más perlas, las perlas pueden introducirse en el microaccionador de gotas, dispensarse como gotas de tampón, transportarse en el microaccionador de gotas y unirse con una o más gotas que incluyen reactivos para inmovilizar las gotas en la superficie de las perlas.

40

Como alternativa, los anticuerpos pueden inmovilizarse fuera del microaccionador de gotas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inmovilizarse en perlas antes de su introducción en el microaccionador de gotas. Están disponibles en el mercado una diversidad de perlas revestidas con proteína (por ejemplo, estreptavidina) y revestidas con anticuerpo. En otra realización, los anticuerpos pueden inmovilizarse en una superficie del microaccionador de gotas, por ejemplo, durante la fabricación del microaccionador de gotas.

45

Además, pueden prepararse superficies para la inmovilización de anticuerpos. Por ejemplo, puede proporcionarse una superficie que incluya restos que tengan afinidad por un anticuerpo o un resto de unión acoplado a un anticuerpo. El anticuerpo, que incluye opcionalmente el resto de unión, puede ponerse en contacto con la superficie inmovilizando de este modo el anticuerpo en la superficie. Por ejemplo, pueden introducirse perlas prerrevestidas con estreptavidina en el microaccionador de gotas. Pueden realizarse operaciones de gotas con gotas que incluyen las perlas revestidas con estreptavidina, y pueden emplearse para poner dichas gotas que contienen perlas en contacto con una o más gotas que

50

incluyen anticuerpo biotinilado, para acoplar de este modo el anticuerpo con las perlas. Como otro ejemplo, el microaccionador de gotas puede incluir una superficie revestida con estreptavidina en una vía de microaccionamiento de gotas, de modo que pueden emplearse operaciones de gotas para poner una gota que incluye anticuerpo biotinilado en contacto con la superficie revestida con estreptavidina y, de este modo, inmovilizar el anticuerpo en la superficie. En otro ejemplo más, pueden inmovilizarse selectivamente anticuerpos de captura sobre la superficie del microaccionador de gotas, por ejemplo, diseñando la superficie para permitir la inmovilización de anticuerpos o acoplado especies fotoactivas directamente con los anticuerpos o con estreptavidina y, después, inmovilizando el anticuerpo selectivamente mediante el uso de un sistema de luz de escritura directa o mediante el uso de una máscara óptica o el uso de otro medio para exponer selectivamente la luz.

Están disponibles una amplia diversidad de técnicas para unir anticuerpos a superficies. Por ejemplo, la superficie puede activarse con Proteína G para permitir la unión de moléculas de anticuerpo por su dominio Fc, dejando la región variable disponible para la captura de diana. El anticuerpo puede unirse covalentemente a superficies de látex por reacción de anticuerpo activado con látex de sulfato/aldehído de poliestireno acoplado con 1,3-diaminopropano. Pueden revestirse perlas de látex de poliestireno blancas de sulfato sin tensioactivo con anticuerpo por incubación con anticuerpo y tampón de conjugación ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30 mM,  $\text{NaHCO}_3$  70 mM, pH 9,5). Puede capturarse anticuerpo biotinilado sobre sustratos revestidos con estreptavidina. Los anticuerpos pueden unirse covalentemente a una superficie modificada del microaccionador de gotas, tal como una capa de silano o tiolada. Los anticuerpos pueden unirse covalentemente a una superficie modificada del microaccionador de gotas (por ejemplo, durante el ensamblaje o usando operaciones de gotas para depositar los anticuerpos en la superficie), tal como una superficie modificada con silano o una superficie tiolada.

#### 6.3.2.2 Unión de Analito Diana a Anticuerpo Inmovilizado

Una gota de muestra se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado para permitir que cualquier analito diana presente en la muestra se una con el anticuerpo inmovilizado. Esta etapa puede efectuarse usando operaciones de gotas para transportar una gota de muestra en contacto con la superficie sobre la que se une el anticuerpo, por ejemplo, una gota que incluye perlas revestidas con anticuerpo o una superficie del microaccionador de gotas sobre la que se inmoviliza el anticuerpo. En una realización alternativa, la superficie es una superficie de perlas y la perla se pone en contacto con la muestra antes de la introducción en el microaccionador de gotas. La perla también puede lavarse antes de la introducción en el microaccionador de gotas. El anticuerpo se une al analito de la gota de muestra. El procedimiento de unión puede acelerarse aumentando la velocidad del transporte de masas. Unos pocos ejemplos de aceleración del transporte de masas incluyen el transporte de las gotas a una alta velocidad para permitir una mezcla minuciosa de las perlas con anticuerpos y el analito diana, o para reponer la superficie de anticuerpo inmovilizado con analitos diana. Otros medios incluyen agitar la gota incubada en su lugar por manipulación eléctrica de la gota o por varios medios externos, tales como procedimientos de accionamiento piezoeléctricos.

En ausencia de cualquier medio de transporte de masas, los acontecimientos de unión se producen basándose en la difusión y podrían llevar tiempos más prolongados, prolongando de este modo los tiempos de ensayo. El anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, las perlas o la superficie) pueden someterse en algunas realizaciones a un protocolo de lavado en el microaccionador de gotas, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.6, para eliminar el exceso de muestra u otros materiales.

#### 6.3.2.3 Unión de Anticuerpo Indicador a Analito de Diana

Después del lavado (por ejemplo, de las perlas o la superficie), una gota que comprende un anticuerpo indicador que tiene afinidad por un epítipo diferente en el analito puede ponerse en contacto con el anticuerpo inmovilizado lavado que tiene potencialmente el analito capturado. El conjugado de anticuerpo marcado incluye un anticuerpo acoplado a una molécula indicadora, tal como una molécula radiactiva, una enzima capaz de catalizar una reacción de detectable (por ejemplo, un cambio de color, quimioluminiscencia, fluorescencia, quimioluminiscencia o electroquímica), una molécula quimioluminiscente o una molécula fluorescente. Dependiendo del indicador usado, el anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, perlas u otra superficie), que incluye el analito y anticuerpo indicador puede someterse después a un protocolo de lavado, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.6, para eliminar el exceso de anticuerpo indicador.

#### 6.3.2.4 Producción y Detección de Parámetros Medibles

El anticuerpo indicador unido puede cuantificarse por detección de una señal facilitada por el anticuerpo indicador. Por ejemplo, la señal puede ser de radiactividad, cambio de color, luminiscencia, fluorescencia, luminiscencia, espectro Raman, estrategias de dispersión de luz, agregación de

partículas/perlas, resonancia de plasmón superficial, efecto espectroscópico Raman y similares. La detección puede ser directa o indirecta, por detección de la cantidad de anticuerpo acoplado al analito o por detección de la cantidad de anticuerpo no unido.

5 Para estrategias que requieren una reacción adicional para producir una señal, por ejemplo, la conversión de un producto no fluorescente en un producto fluorescente, una gota que incluye los reactivos necesarios adicionales puede ponerse en contacto con complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo para facilitar la reacción adicional.

10 Una vez que se ha permitido que el anticuerpo indicador se una al analito, el exceso de anticuerpo indicador puede eliminarse por lavado usando un protocolo de lavado, y pueden usarse operaciones de gotas para poner una gota que incluye los reactivos indicadores necesarios en contacto con el anticuerpo inmovilizado. En una realización, el anticuerpo indicador está marcado con una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (ALP)) capaz de catalizar una reacción que produce un parámetro medible. Por ejemplo, puede usarse HRP para catalizar el peróxido de hidrógeno para generar una señal electroquímica que puede detectarse por medición de la corriente o voltaje. La detección de anticuerpo unido puede conseguirse mediante una reacción de fluorescencia catalizada por la HRP usando Amplex Red y peróxido de hidrógeno como sustratos. Otro ejemplo emplea una conversión mediada por fosfatasa alcalina de NBT en formazán violeta, que puede detectarse en una gota colorimétricamente. En otra estrategia, un sustrato de quimioluminiscencia tal como luminol o Psatto de Lumigen podría catalizarse por HRP para generar una señal de quimioluminiscencia. Otros ejemplos de estrategias de detección adecuadas se analizan en otra parte en el presente documento.

20 En una realización, la etapa de detección se realiza en una gota en el microaccionador de gotas en presencia de un sensor para aumentar o maximizar la captura de señal a partir de la reacción. En otra realización, la reacción se realiza lejos de un sensor y la gota se transporta usando operaciones de gotas en presencia de un sensor con fines de detección.

### 25 6.3.2.5 Estrategias de Ensayo de Tipo Sándwich Alternativas

Se apreciará que son posibles una diversidad de estrategias alternativas. Por ejemplo, las etapas no tienen que realizarse en el orden descrito anteriormente, por ejemplo, el anticuerpo indicador puede unirse al analito antes de o al mismo tiempo que se expone el analito al anticuerpo inmovilizado. En otra estrategia, la unión de anticuerpo de captura, analito y anticuerpo indicador pueden realizarse todas simultáneamente y después presentarse a un sitio de captura y, entonces, lavarse. En algunas estrategias, tales como dispersión Raman de resonancia aumentada en superficie, no es necesario lavado.

### 30 6.3.3 Ensayo Basado en Afinidad Competitivo

35 En una realización, la invención proporciona un ensayo basado en afinidad competitivo realizado en un microaccionador de gotas. Los analitos para la detección por ensayo basado en afinidad competitivo son típicamente aquellos que son demasiado pequeños para unirse a dos anticuerpos, como requiere un ensayo de tipo sándwich se apreciará que son posibles una amplia diversidad de protocolos dentro del ámbito de la invención para realizar ensayos basados en afinidad competitivos. El siguiente protocolo basado en gotas, que se basa en la ilustración de la Figura 5, se proporciona solamente a modo de ilustración y no pretende ser limitante del ámbito de la invención:

- 40 (1) inmovilizar en una superficie un anticuerpo con especificidad por un analito diana;
- (2) lavar el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, usando protocolo de lavado basado en gotas, para eliminar el exceso de anticuerpo;
- 45 (3) proporcionar una gota de muestra que incluye potencialmente analito diana y que incluye un analito indicador;
- (4) exponer el analito inmovilizado a la gota combinada de analito diana/analito indicador de modo que el analito indicador compite con cualquier analito diana por sitios de unión;
- (5) lavar el sustrato para eliminar el analito y el analito indicador no unidos;
- (6) opcionalmente, realizar etapas adicionales para producir un parámetro o señal medible; y
- 50 (7) cuantificar el analito indicador unido, en el que la cantidad de analito indicador es inversamente proporcional a la cantidad de analito diana.

Una o más de cualquiera de las etapas anteriores pueden realizarse usando técnicas de

manipulación de gotas en un microaccionador de gotas como se describe en el presente documento. Cada una de las etapas se analiza con más detalle en las secciones subsiguientes.

#### 6.3.3.1 Inmovilización de Anticuerpo

5 El anticuerpo puede inmovilizarse como se describe en la Sección **¡Error! No se encuentra la fuente de referencia.**

#### 6.3.3.2 Unión Competitiva

10 Una gota que incluye la muestra que incluye potencialmente un analito diana se combina con una gota que incluye el analito indicador, y la gota combinada se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado. Como alternativa, la mezcla de diana e indicador se efectúa durante la carga del microaccionador de gotas.

15 El analito indicador puede generarse por acoplamiento del ácido nucleico indicador con el analito usando cualquiera de una diversidad de procedimientos de conjugación. En una realización, la porción de analito se modifica con una molécula, tal como biotina, que genera un sitio de captura secundario para inmovilizar un complejo de ADN sensor con estreptavidina. El acoplamiento de biotina al analito no debe interferir excesivamente con su unión al anticuerpo de captura. El material biotinilado puede competir en algunos casos igualmente con el analito de la muestra de ensayo. El acoplamiento del analito biotinilado con una molécula indicadora puede producirse antes o después de que el analito biotinilado se capture por el anticuerpo inmovilizado.

20 Por ejemplo, en una realización, el ensayo se realiza mezclando una gota con una cantidad conocida de analito biotinilado con la gota de muestra que contiene potencialmente una cantidad desconocida de analito no modificado. Una gota que incluye el analito biotinilado se combina con una gota que incluye potencialmente el analito diana. La gota combinada se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado, de modo que el analito biotinilado y el analito diana (si existe) compiten por la unión al anticuerpo inmovilizado. La cantidad de analito biotinilado unido es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la gota de ensayo. El anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, las perlas o la superficie) puede someterse después a un protocolo de lavado, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.6, para eliminar el exceso del analito indicador.

#### 6.3.3.3 Detección del Analito Indicador

30 Después del lavado, una gota con un complejo indicador con estreptavidina-biotina se añade una gota que incluye las perlas lavadas o puestas en contacto de otro modo con una superficie que incluye el anticuerpo inmovilizado. El complejo indicador con estreptavidina-biotina se une a cualquier analito biotinilado que se hubiese capturado por el anticuerpo en la perla.

#### 6.4 Inmuno-PCR

35 La invención proporciona una inmuno-PCR basada en gotas (Pick) para detectar con sensibilidad analitos que estén disponibles sólo a niveles traza. La presente invención combina los diversos medios de ensayo basados en afinidad que usan un anticuerpo detector en una plataforma basada en gotas y utiliza una cadena de ácido nucleico como marcador. Esta cadena de ácido nucleico se amplifica usando técnicas de amplificación (véase, por ejemplo, la Sección 6.1).

40 Se apreciará que un aspecto importante de la invención implica la capacidad para realizar operaciones de gotas usando cada uno de los reactivos de iPCR necesarios y/o muestras en un microaccionador de gotas. Por ejemplo, la invención incluye:

- 45
- (1) un microaccionador de gotas que comprende en el mismo una gota que comprende uno o más de cualquiera de los reactivos y/o muestras descritos en el presente documento para realizar protocolos de iPCR;
  - (2) un dispositivo o sistema de la invención que comprende dicho microaccionador de gotas;
  - (3) un procedimiento de realización de operaciones de gotas en, o manipulando de otro modo una gota, que hace uso de dicho sistema o microaccionador de gotas; y/o
  - (4) un procedimiento de realización de un ensayo basado en afinidad basado en gotas que hace uso de dicho sistema o microaccionador de gotas.

#### 6.4.1 iPCR tipo Sándwich

En una realización, la invención proporciona una iPCR de tipo sándwich basada en gotas realizada en un microaccionador de gotas. En general, la iPCR de tipo sándwich implica:

- (1) inmovilizar en una superficie un anticuerpo con especificidad por un analito diana;
- (2) lavar el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, usando un protocolo de lavado basado en gotas;
- 5 (3) exponer el anticuerpo inmovilizado a una gota de muestra que incluye potencialmente el analito diana;
- (4) lavar el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, usando un protocolo de lavado basado en gotas;
- (5) exponer el anticuerpo inmovilizado (que incluye ahora potencialmente el analito diana unido al mismo) a una gota que incluye un segundo anticuerpo conjugado con una molécula de ácido nucleico:
- 10 (6) lavar el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, usando un protocolo de ensayo basado en gotas;
- (7) amplificar el ácido nucleico y detectar la amplificación (si existe) para determinar la presencia y cantidad de analito diana capturado.

Una o más de cualquiera de las etapas anteriores puede realizarse usando técnicas de manipulación de gotas en un microaccionador de gotas como se describe en el presente documento. Cada una de las etapas se analiza con más detalle en las secciones subsiguientes.

##### 6.4.1.1 Inmovilización de Anticuerpo

Un anticuerpo primario se inmoviliza en una superficie. La superficie puede ser, por ejemplo, una superficie del microaccionador de gotas, o la superficie de perlas, tales como perlas magnéticamente sensibles. La inmovilización del anticuerpo en la superficie puede efectuarse en el microaccionador de gotas usando protocolos basados en gotas. Por ejemplo, los reactivos para inmovilizar un anticuerpo en una superficie pueden introducirse en el microaccionador de gotas, dispensarse como gotas separadas y transportarse en contacto con la superficie para su deposición. Cuando la superficie en cuestión es la superficie de una o más perlas, las perlas pueden introducirse en el microaccionador de gotas, dispensarse como gotas en un tampón, transportarse y unirse con una o más gotas que incluyen reactivos para inmovilizar las gotas en la superficie de las perlas.

Están disponibles una amplia diversidad de técnicas para la unión de anticuerpo a superficies. Por ejemplo, la superficie puede activarse con Proteína G para permitir la unión de moléculas de anticuerpo a través de su dominio Fc, dejando la región variable disponible para la captura de diana. El anticuerpo puede unirse covalentemente a superficies de látex por reacción de anticuerpo activado con látex de sulfato/aldehído de poliestireno acoplado con 1,3-diaminopropano. Pueden revestirse perlas de látex de poliestireno blancas de sulfato sin tensioactivo con anticuerpo por incubación con anticuerpo y tampón de conjugación ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30 mM,  $\text{NaHCO}_3$  70 mM, pH 9,5). Puede capturarse anticuerpo biotilado sobre sustratos revestidos con estreptavidina. También puede realizarse una inmovilización dirigida por luz, por ejemplo, como se describe en otra parte en la presente divulgación.

##### 6.4.1.2 Unión de Analito Diana a Anticuerpo Inmovilizado

Una gota de muestra se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado para permitir que cualquier analito diana presente en la muestra se una con el anticuerpo inmovilizado. Esta etapa puede efectuarse por transporte de una gota de muestra en contacto con una superficie del microaccionador de gotas sobre la que se inmoviliza el anticuerpo. En otra realización, la etapa puede efectuarse uniendo una gota de muestra con una gota que incluye perlas sobre las que se ha inmovilizado el anticuerpo. El anticuerpo se une al analito de la gota de muestra. El anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, las perlas o la superficie) puede someterse a un protocolo del lavado, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.6.

##### 6.4.1.3 Unión de Anticuerpo-NA a Analito Diana

Después del lavado (por ejemplo, de las perlas o la superficie), una gota que comprende un conjugado de anticuerpo-NA que tiene afinidad por un epítipo diferente en el analito puede ponerse en contacto con el anticuerpo inmovilizado lavado que tiene potencialmente el analito capturado. El conjugado de anticuerpo-NA incluye una molécula de ácido nucleico acoplada al anticuerpo. La molécula de ácido nucleico sirve como molde de ácido nucleico para su amplificación. El anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, las perlas o la superficie) se somete después a un protocolo de lavado, por ejemplo, como

se describe en la Sección 6.6.

#### 6.4.1.4 Amplificación de Ácido Nucleico

5 El ácido nucleico se amplifica, por ejemplo, como se describe en la Sección 6.1. La cantidad de producto amplificado producido se mide, por ejemplo, usando detección de fluorescencia a tiempo real, detección electroquímica y/o electroquimioluminiscente. La cantidad de producto de PCR producido se correlaciona con la cantidad de anticuerpo-ADN unido, que depende a su vez de la cantidad de analito presente en la gota de muestra.

#### 6.4.1.5 Estrategia Alternativa

10 En una realización alternativa, el orden de estas etapas se invierte generalmente para realizar la amplificación de ácido nucleico seguida de un ensayo basado en afinidad que da como resultado una señal óptica o eléctrica. En esta secuencia, se realizaría un inmunoensayo para controlar la amplificación de ácido nucleico.

#### 6.4.2 iPCR Competitiva

15 En una realización, la invención proporciona una iPCR competitiva realizada en un microaccionador de gotas. Los analitos para la detección por iPCR competitiva son típicamente aquellos que son demasiado pequeños para unirse a dos anticuerpos, como requiere un ensayo de tipo sándwich. En general, la iPCR competitiva implica:

- (1) inmovilizar en una superficie un anticuerpo con especificidad por un analito diana;
- 20 (2) combinar una gota de muestra que incluye potencialmente analito diana con una gota que incluye un analito indicador;
- (3) exponer el anticuerpo inmovilizado a la gota combinada de analito diana/analito indicador, de modo que el analito indicador compite con cualquier analito diana por sitios de unión;
- (4) lavar el sustrato para eliminar el analito no unido;
- (5) acoplar el analito indicador unido a un ácido nucleico indicador; y
- 25 (6) amplificar el ácido nucleico indicador y controlar el desarrollo de la amplificación para determinar la cantidad de analito indicador no unido, que para el analito indicador unido es inversamente proporcional a la cantidad de analito diana en la muestra.

30 Una o más de cualquiera de las etapas anteriores pueden realizarse usando técnicas de manipulación de gotas en un microaccionador de gotas como se describe en el presente documento. Cada una de las etapas se analiza con más detalle en las secciones subsiguientes.

##### 6.4.2.1 Unión Competitiva

Una gota que incluye la muestra que incluye potencialmente un analito diana se combina con una gota que incluye el analito indicador y la gota combinada se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado.

35 El analito indicador puede generarse por acoplamiento del ácido nucleico indicador con el analito usando cualquiera de una diversidad de procedimientos de conjugación. En una realización, la porción de analito se modifica con una molécula, tal como biotina, que genera un sitio de captura secundario para inmovilizar un complejo de estreptavidina-ADN. El acoplamiento de biotina con el analito no debe interferir excesivamente con su unión al anticuerpo de captura primario. El material biotinilado puede competir en algunos casos igualmente con el analito de la muestra. El acoplamiento del analito biotinilado con el ácido nucleico indicador puede producirse antes o después de que el analito biotinilado se capture por el anticuerpo inmovilizado.

40 Por ejemplo, en una realización, el ensayo se realiza mezclando una gota con una cantidad conocida de analito biotinilado con la gota de muestra que contiene potencialmente una cantidad desconocida de analito no modificado. Una gota que incluye el analito biotinilado se combina con una gota que incluye potencialmente el analito diana. La gota combinada se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado, de modo que el analito biotinilado y el analito diana (si existe) compiten por la unión al anticuerpo inmovilizado. La cantidad de analito biotinilado unido es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la gota de muestra.

#### 6.4.2.2 Acoplamiento al Indicador de Ácido Nucleico

Después del lavado, se añade una gota con un complejo de ácido nucleico indicador con estreptavidina-biotina a una gota que incluye las perlas o la superficie lavadas. El complejo de ácido nucleico indicador con estreptavidina-biotina se une a cualquier analito biotinilado que se hubiese capturado por el anticuerpo en la perla.

#### 6.4.2.3 Amplificación del Ácido Nucleico

Después del lavado, la cantidad de un complejo de ácido nucleico indicador con estreptavidina-biotina inmovilizado se determina por amplificación del ácido nucleico indicador. La señal de amplificación es una medida inversa de la cantidad de analito en la muestra original. La amplificación puede desarrollarse como se describe en la Sección 6.1. La presencia y la cantidad de producto amplificado producido se miden, por ejemplo, usando detección de fluorescencia a tiempo real. La cantidad de analito indicador que se desplazó es proporcional a la cantidad de analito diana en la muestra.

#### 6.4.2.4 Estrategias Alternativas

Las etapas no se limitan al orden dado. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse al analito diana/analito indicador antes de que se inmovilice por combinación de una gota que incluye el anticuerpo libre con una o más gotas que incluyen el analito diana/analito indicador, después de lo cual el anticuerpo puede ponerse en contacto con la superficie para su inmovilización. El analito indicador puede conjugarse con el ácido nucleico indicador en el microaccionador de gotas por combinación de gotas que incluyen los dos reactivos. Una gota que incluye el analito indicador puede combinarse con una gota que incluye el ácido nucleico indicador para efectuar la conjugación antes o después de que el analito indicador se exponga al anticuerpo capturado. Son posibles una diversidad de alternativas dentro del ámbito de la invención.

#### 6.4.3 Muestras y Preparación de Muestras

Una amplia diversidad de analitos pueden detectarse usando protocolos de iPCR basados en gotas de la invención. Una sola muestra puede analizarse para uno o más analitos diana. Los analitos pueden ser, por ejemplo, analitos biológicos o analitos sintéticos. Por ejemplo, en una realización, los analitos se seleccionan de las categorías siguientes: analitos de fuentes bacterianas, analitos de fuentes virales, analitos de fuentes de esporas, analitos de toxinas proteicas y analitos de toxinas de bajo peso molecular. En una realización, los analitos diana incluyen toxinas o analitos indicativos de la presencia de organismos biológicos específicos, por ejemplo, enfermedades infecciosas, o toxinas que se emplean en el bioterrorismo o la guerra biológica. Los ejemplos de dichos organismos incluyen el carbunco, la gripe aviar, el botulismo, hantavirus, legionelosis, plaga neumónica, viruela, tularemia y fiebres hemorrágicas virales (FHV).

#### 6.4.4 Protocolos de Inmuno-PCR

El sistema de la invención permite que se realicen simultáneamente múltiples ensayos de inmuno-PCR en una sola muestra. Además, los ensayos de inmuno-PCR pueden realizarse junto con otros ensayos, tales como PCR y/o ensayos basados en afinidad.

#### 6.5 Analizador Multi-Analito

Diversos protocolos para la amplificación de ácidos nucleicos, la secuenciación de ácidos nucleicos, ensayos basados en afinidad, manipulación de células, manipulación y lavado de perlas, y protocolos de detección de analitos pueden integrarse también fácilmente en un solo sistema microaccionador de gotas. En una realización, un solo microaccionador de gotas incluye reactivos y componentes de detección para realizar la amplificación de ácidos nucleicos y la secuenciación de ácidos nucleicos. En otra realización, un solo microaccionador de gotas incluye reactivos y componentes de detección para realizar la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de un patógeno sanguíneo y reactivos y componentes de detección para realizar uno o más ensayos distintos de los tipos de ensayo y/o para los tipos de analito como se describen en el presente documento. En otra realización, un microaccionador de gotas incluye componentes para manipular células junto con componentes y reactivos para realizar ensayos basados en afinidad.

#### 6.6 Superficies y Protocolos de Lavado de Superficies

Diversos protocolos de la invención requieren superficies para la inmovilización de reactivos. Por ejemplo, pueden usarse tensioactivos para capturar o inmovilizar componentes diana de una gota, tales como células, otras perlas, micropartículas, nanopartículas, anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos

nucleicos, moléculas pequeñas y/o otros componentes químicos. Las superficies usadas para tales fines pueden incluir, por ejemplo, superficies de perlas, micropartículas, nanopartículas, membranas, objetos físicos y/o superficies de microaccionadores de gotas. Diversos protocolos requieren una etapa de lavado en la que los materiales no unidos se eliminan de una o más superficies.

5 Una gota de muestra que incluye uno o más componentes diana para su captura puede ponerse en contacto, usando operaciones de gotas, con una superficie que tiene afinidad por dichas dianas. Pueden usarse protocolos de lavado de la invención para eliminar de la superficie componentes no unidos de la gota de muestra. Por ejemplo, puede usarse un protocolo de gotas para poner una o más gotas que incluyen uno o más componentes diana en contacto con una o más superficies, de modo que uno o más componentes diana puedan inmovilizarse o capturarse en las unas o más superficies. Puede ejecutarse un protocolo de lavado para eliminar sustancias no unidas de las unas o más superficies. De forma similar, puede usarse un protocolo de gotas para poner una o más gotas que incluyen uno o más componentes diana en contacto con una o más perlas, de modo que el uno o más componentes diana pueden inmovilizarse o capturarse en la una o más perlas. Puede ejecutarse un protocolo de lavado para separar las sustancias no unidas de la una o más perlas.

10 El lavado implica generalmente poner una o más gotas de lavado en contacto con la superficie inmovilizada. El lavado puede implicar la agitación de las gotas mientras están en contacto con la superficie. Las gotas de lavado pueden incluir, por ejemplo, agua, agua desionizada, soluciones salinas, soluciones ácidas, soluciones básicas, soluciones de detergente y/o tampones.

20 Los protocolos de lavado de la invención dan como resultado una eliminación altamente eficaz de sustancias no unidas de la superficie. En una realización, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar una gota en contacto con una superficie con una concentración reducida de una sustancia. Este procedimiento puede incluir en general proporcionar una superficie en contacto con una gota que comprende una concentración de partida de la sustancia, y que tiene un volumen de partida; realizar una o más operaciones de gotas para unir una gota de lavado con la gota para dar una gota combinada; y realizar una o más operaciones de gotas para dividir la gota combinada para dar un conjunto de gotas que incluye: (i) una gota en contacto con la superficie que tiene una concentración disminuida y una cantidad disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida; y (ii) una gota que está separada de la superficie.

30 El procedimiento de la invención puede dar una gota en contacto con la superficie que tiene una cantidad disminuida o cantidad sustancialmente disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida. La gota resultante puede tener en algunas realizaciones un volumen que sea aproximadamente el mismo que el volumen de partida. En algunas realizaciones, las etapas de lavado pueden repetirse hasta que se alcance o supere una cantidad máxima predeterminada del uno o más componentes en la gota resultante. La cantidad predeterminada puede representar una reducción sustancial respecto a la concentración de partida. En algunos casos, la gota resultante puede estar sustancialmente libre de los componentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la reducción en la cantidad supera el 99, 99,9, 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999, 99,999999 por ciento en una base molar.

40 El procedimiento de la invención puede producir una gota en contacto con la superficie que tiene una concentración disminuida o una concentración sustancialmente disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida. La gota resultante puede tener en algunas realizaciones un volumen que sea aproximadamente el mismo que el volumen de partida. En algunas realizaciones, las etapas de lavado pueden repetirse hasta que se alcance o supere una concentración máxima predeterminada del uno o más componentes en la gota resultante. El límite de concentración predeterminado puede representar una reducción sustancial respecto a la concentración de partida. En algunos casos, la gota resultante puede estar sustancialmente libre de los componentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la reducción en la concentración supera el 99, 99,9, 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999, 99,999999 por ciento.

#### 6.6.1 Lavado de Perlas

50 Para protocolos que hacen uso de perlas, una gota con perlas puede combinarse usando operaciones de gotas con una o más gotas de lavado. Después, mientras se retienen las perlas (por ejemplo, físicamente o magnéticamente), la gota unida puede dividirse usando operaciones de gotas en dos o más gotas: una o más gotas con perlas y una o más gotas sin una cantidad sustancial de perlas. En una realización, la gota unida se divide usando operaciones de gotas en una gota con perlas y una gota sin una cantidad sustancial de perlas.

55 Generalmente, cada ejecución de un protocolo de lavado da como resultado la retención de suficientes perlas para realizar el ensayo deseado sin efectos excesivamente perjudiciales sobre los resultados del ensayo. En ciertas realizaciones, cada división de la gota unida da como resultado la

retención de más del 90, 95, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99, 99,9, 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999 ó 99,999999 por ciento de perlas. En otras realizaciones, cada ejecución de un protocolo de lavado para conseguir una reducción predeterminada en la concentración y/o cantidad de la sustancia eliminada da como resultado la retención de más del 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99, 99,9, 99,99, 99,999, 99,9999, 99,99999 ó 99,999999 por ciento de perlas. En otras realizaciones más, la cantidad de perlas retenidas se calcula y los resultados se ajustan por consiguiente.

En algunas realizaciones, las perlas pueden lavarse en depósitos en los que la gota que contiene perlas y las gotas de lavado se combinan, las perlas se retienen (por ejemplo, mediante un imán, por estructuras físicas, fuerzas electroestáticas), y las gotas que carecen de perlas se dispensan desde el depósito usando operaciones de gotas. Por ejemplo, las perlas pueden lavarse mediante una estrategia de dilución y dispensación por la que se añade un tampón de lavado al depósito para diluir el contenido, las perlas magnéticamente sensibles se localizan dentro del depósito con un imán y la mayor parte de la solución se dispensa desde el depósito, y este ciclo se repite hasta que se alcanzan niveles aceptables de lavado.

Un ejemplo no limitante ilustrado en la Figura 6 implica inmovilizar perlas magnéticamente sensibles usando un campo magnético. Las perlas magnéticamente sensibles inmovilizadas pueden liberarse por reducción o eliminación del campo magnético. El lavado de perlas magnéticamente sensibles puede incluir generalmente las etapas siguientes:

(1) usar operaciones de gotas para situar una gota 1101 que comprende perlas magnéticamente sensibles 1102 y sustancias no unidas 1103 en proximidad a un imán 1104;

(2) usar operaciones de gotas para combinar una gota de lavado 1106 con la gota 1101 que comprende las perlas magnéticamente sensibles 1102;

(3) inmovilizar las perlas 1102 por aplicación de un campo magnético;

(4) usar operaciones de gotas para eliminar algunas o todas las gotas que rodean las perlas para dar una gota 1108 que comprende las perlas con una concentración reducida de sustancia diana no unida y una gota 1110 que comprende una sustancia diana no unida;

(5) liberar las perlas 1102 por eliminación del campo magnético;

(6) repetir las etapas (2) a (3) o (2) a (4) hasta que se alcance un grado predeterminado de purificación.

De esta forma, las sustancias no unidas, tales como contaminantes, subproductos o exceso de reactivos, pueden separarse de las perlas. Cada ciclo produce una gota que incluye las perlas pero con un nivel disminuido de las sustancias no deseadas. La etapa (5) no es necesaria en cada ciclo de lavado; sin embargo, puede ser útil para mejorar el lavado por liberación de contaminantes que pueden estar atrapados en las perlas inmovilizadas. Las etapas pueden realizarse en un orden diferente, por ejemplo, las etapas (2) y (3) pueden invertirse. Las etapas en el protocolo de lavado pueden efectuarse en un microaccionador de gotas usando operaciones de gotas como se describen en el presente documento.

Otra realización se ilustra en la Figura 7 y puede comprender una placa superior 1201, una placa inferior 1202, electrodos 1203 y un imán 1204. Las etapas de la realización pueden incluir generalmente:

(1) usar operaciones de gotas para combinar un lingote 1205 con una gota 1206 que comprende perlas magnéticamente sensibles 1207 y material no unido 1208 en proximidad a un imán 1204;

(2,3) con las perlas 1207 inmovilizadas, usar operaciones de gotas para transportar el lingote combinado resultante 1210 a través de las perlas 1207 para separar el material no unido 1208 de las perlas 1207;

(4) usar operaciones de gotas para eliminar por separación una porción del lingote combinado 1210 para dar una porción 1212 que comprende las perlas con una concentración reducida de sustancia diana no unida y una porción 1214 que comprende sustancia diana no unida;

(5) repetir las etapas (1)-(4) según sea necesario para conseguir la reducción deseada en el material no unido.

En una estrategia relacionada, el lingote puede complementarse continuamente por adición de gotas de lavado adicionales y/o lingotes a medida que el lingote se transporta a través de las perlas inmovilizadas. El procedimiento puede continuar hasta que se alcance la reducción deseada en el material no unido.

La Figura 8 ilustra una realización alternativa que también puede comprender una placa superior 1301, una placa inferior 1302, electrodos 1303 y un imán 1304. En esta realización, el imán 1304 se mueve, tal como en la dirección de A1, para separar las perlas 1305 del material no unido 1306 en un lingote combinado 1307 en lugar de mover el lingote 1307. Una estrategia similar implica el movimiento tanto del imán como del lingote para conseguir la separación (no se muestra). Otra estrategia más implica el uso de múltiples imanes para mover las perlas (no se muestra).

En realizaciones en las que se usan perlas magnéticamente sensibles, los inventores han descubierto que la aplicación de un campo magnético, aunque es útil para inmovilizar temporalmente las perlas, mover las perlas y/o ubicar las perlas, a veces da como resultado una agregación no deseada de las perlas. En una realización, se incluye un tensioactivo para evitar o reducir la agregación de perlas. Los ejemplos de tensioactivos adecuados para este fin incluyen: Tween®20, Tween®80, Triton X-100. Los tensioactivos deberían seleccionarse y usarse en cantidades que reduzcan o eliminen la agregación de perlas y minimicen la adsorción inespecífica mientras que al mismo tiempo no den como resultado una pérdida significativa de analitos diana o reactivos de la gota.

Otra estrategia para eliminar o reducir la agregación por aglutinación de perlas implica el uso de pequeñas cantidades de perlas de mayor tamaño. Puede usarse cualquier cantidad de perlas que pueda estar contenida en una gota durante una o más operaciones de gotas. En algunas realizaciones, el número de perlas magnéticamente sensibles puede variar de una a varios cientos de miles. Por ejemplo, en una realización, la invención hace uso de una a 100 perlas magnéticamente sensibles por gota. Por ejemplo, la invención puede hacer uso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ...100 perlas magnéticamente sensibles por gota. En una realización, el número de perlas magnéticamente sensibles es de una a 10. El uso de menores cantidades de perlas magnéticamente sensibles permite que se usen perlas de mayor tamaño. Por ejemplo, en una realización, la invención hace uso de una a 100 perlas magnéticamente sensibles por gota, en la que las perlas tienen un diámetro medio de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 micrómetros. En otra realización, la invención hace uso de una a 10 perlas magnéticamente sensibles por gota, en la que las perlas tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 micrómetros.

## 6.7 Manipulación de Células

La captura inmunogénica de células pertinentes puede efectuarse usando perlas con anticuerpo, tales como perlas anti-citoqueratina, y puede usarse para capturar células pertinentes a partir de una muestra antes de su introducción en el microaccionador de gotas y/o a partir de una gota en un microaccionador de gotas. La unión puede aumentarse o los tiempos de incubación pueden reducirse en el microaccionador de gotas trasladando activamente la gota o agitando vorticialmente la gota dentro de un depósito. Las perlas pueden aislarse y lavarse como se describe en otra parte en el presente documento. Las células diana pueden liberarse en una suspensión en una gota en el microaccionador de gotas.

## 6.8 Arquitectura y Funcionamiento del Microaccionador de Gotas

El sistema de la invención incluye generalmente un microaccionador de gotas controlado por un procesador. Por ejemplo, el procesador puede, entre otras cosas, programarse para controlar manipulaciones de gotas en un microaccionador de gotas. Son posibles una amplia diversidad de configuraciones de microaccionadores de gotas. Se proporciona una ilustración en la Figura 3. Los ejemplos de componentes que pueden configurarse en un microaccionador de gotas de la invención incluyen diversos fluidos de carga que pueden cargarse en el microaccionador de gotas; mecanismos de carga de fluido para introducir fluido de carga, muestra y/ reactivos en el microaccionador de gotas; diversos depósitos, tales como depósitos de entrada y depósitos de procesamiento; mecanismos de dispensación de gotas; medios para controlar la temperatura del microaccionador de gotas, del fluido de carga y/o de una gota en un microaccionador de gotas; y componentes generadores de campo magnético para manipular perlas magnéticamente sensibles en un microaccionador de gotas. Esta sección analiza estos y otros aspectos del microaccionador de gotas y su uso en los sistemas de la invención.

### 6.8.1 Microaccionador de Gotas

Los sistemas hacen uso de un microaccionador de gotas. El microaccionador de gotas incluirá un sustrato con uno o más electrodos dispuestos para realizar una o más operaciones de gotas. En algunas realizaciones, el microaccionador de gotas incluirá una o más series, vías o redes de dichos electrodos. Pueden emplearse una diversidad de propiedades eléctricas para efectuar operaciones de gotas. Los ejemplos incluyen electrohumectación y electroforesis.

Diversos componentes de la invención pueden incluirse como componentes del microaccionador

de gotas. De hecho, puede proporcionarse todo un sistema de la invención como un microaccionador de gotas integrado. En algunas realizaciones, el microaccionador de gotas incluye diversos sensores y medios para acoplar electrónicamente los sensores a circuitos externos. En otras realizaciones, el microaccionador de gotas incluye calentadores y/o elementos generadores de campo magnético y medios para acoplar dichos elementos a circuitos externos. Además, un microaccionador de gotas que incluye uno o más de cualquiera de los reactivos descritos en el presente documento en un depósito o en forma de gota también es un aspecto de la invención.

#### 6.8.1.1 Operaciones de Gotas

El microaccionador de gotas puede realizar diversas operaciones de gotas con respecto a una gota. Los ejemplos incluyen: cargar una gota en el microaccionador de gotas; dispensar una o más gotas a partir de una gota de fuente; escindir, separar o dividir una gota en dos o más gotas; transportar una gota desde una localización a otra en cualquier dirección; unir o combinar dos o más gotas en una sola gota; diluir una gota; mezclar una gota, agitar una gota; deformar una gota; retener una gota en su posición; incubar una gota; calentar una gota; vaporizar una gota; enfriar una gota; deshacerse de una gota; transportar una gota fuera de un microaccionador de gotas; otras operaciones de gota descritas en el presente documento; y/o cualquier combinación de las anteriores.

La escisión de gotas o la división de gotas implica generalmente separar una gota en dos o más subgotas. En algunos casos, las gotas resultantes son relativamente del mismo tamaño.

El transporte implica mover una gota desde una localización a otra en cualquier dirección. Las gotas pueden transportarse en un plano o en tres dimensiones. Se apreciará que una diversidad de operaciones de gotas, tales como la dispensación y/o escisión, pueden incluir un elemento de transporte, en el que una gota se transporta lejos de otra gota. La unión implica combinar dos o más gotas en una sola gota. En algunos casos, se unen entre sí gotas de relativamente el mismo tamaño. En otros casos, una gota puede unirse en una gota de mayor tamaño, por ejemplo, combinando una gota con un volumen mayor presente en un depósito.

La invención incluye operaciones de gotas que usan gotas que comprenden perlas. Se describen una diversidad de dichas operaciones en otra parte en el presente documento. En una realización, se usan perlas para realizar operaciones de gotas en reactivos que tienden a interferir con las operaciones de gotas. Por ejemplo, ciertas proteínas pueden tender a unirse a superficies de un microaccionador de gotas y/o a repartirse en el fluido de carga. La inmovilización de dichos compuestos en perlas hidrófilas puede usarse para facilitar las operaciones de gotas usando los compuestos. Los compuestos pueden unirse a las perlas y las perlas pueden estar contenidas en una gota que se somete a operaciones de gotas.

#### 6.9 Sistemas

La carga de fluido puede efectuarse usando sistemas microaccionadores de gotas tal como se ilustra en la Figura 9. Las etapas de un protocolo de carga de fluido pueden realizarse usando un sistema de control de gotas 1801. Pueden escribirse un conjunto de instrucciones ejecutables por ordenador que pueden cargarse en un controlador para la ejecución de un protocolo de carga. También pueden usarse sistemas integrados que incluyen el sistema de control de gotas 1801 y el sistema de ejecución de protocolo 1802. El sistema de control de gotas 1801 permite a un usuario controlar las funciones del sistema microaccionador de gotas, tales como las operaciones de gotas y las operaciones de sensores para protocolos de carga de fluido. El sistema de ejecución de protocolo 1802 permite a un usuario ejecutar rutinas de software que controlan las funciones del sistema microaccionador de gotas, tales como las operaciones de gotas y las operaciones de carga de fluido. La invención también proporciona un procedimiento o instrucciones utilizables por ordenador para realizar protocolos o procedimientos de carga de fluido. La flexibilidad programable de la plataforma permite que los ensayos se optimicen rápidamente y permite que se implanten etapas de ejecución condicionales. Por ejemplo, pueden ejecutarse calibraciones, ensayos de confirmación o controles adicionales si se desencadenan por un resultado de ensayo particular. En algunas realizaciones, el sistema puede integrar etapas de preparación de muestra. La automatización del sistema y de las operaciones del microaccionador en gotas mejora la portabilidad y permite que los ensayos se realicen más rápidamente y por personal con un entrenamiento mínimo, reduciendo de este modo los errores humanos.

En referencia además a la Figura 9, a un alto nivel, cada uno de los sistemas de la invención incluye típicamente un procesador o controlador 1803, un microaccionador de gotas 1804, un sensor o detector 1805, un dispositivo o dispositivos de entrada 1806, un dispositivo o dispositivos de salida 1807 y un software. La Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 60/806.412, titulada "Systems and Methods for Droplet Microactuator Operations", presentada el 30 de junio de 2006, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia, describe sistemas microaccionadores de gotas que

pueden emplearse junto con los aspectos de microaccionadores de gotas de la invención. El sistema de control de gotas incluye un software de control de gotas procesado en un ordenador 1808 y programado para desplegar una interfaz de control de gotas para controlar las funciones del sistema microaccionador de gotas. El sistema de ejecución de protocolo incluye un software de ejecución de protocolo programado para facilitar la ejecución de un conjunto de instrucciones ejecutables por ordenador o utilizables por ordenador para controlar las funciones del sistema microaccionador de gotas para realizar la carga de fluido.

#### 6.9.1 Controlador

El sistema de la invención puede incluir un controlador 1803. El controlador sirve para proporcionar capacidades de procesamiento, tales como almacenar, interpretar y/o ejecutar instrucciones de software. El controlador puede estar, por ejemplo, compuesto por un procesador digital de señales (DSP) con memoria, un microcontrolador o un circuito integrado de aplicación específica (ASIC). Un ejemplo de un procesador DSP adecuado es el procesador DSP Analog Devices Blackfin.

El controlador está electrónicamente acoplado a diversos componentes de hardware de la invención, tales como el microaccionador de gotas, cualquier sensor y cualquier dispositivo de entrada y/o salida. El controlador puede configurarse y programarse para controlar datos y/o aspectos de energía de estos dispositivos. Por ejemplo, con respecto al microaccionador de gotas, el controlador controla la manipulación de gotas por activación/desactivación de electrodos. Este aspecto de la invención se analiza adicionalmente en la Sección 6.8.

El controlador puede estar además electrónicamente acoplado a un sistema informático separado que incluye un procesador, dispositivos de entrada y salida, un medio de almacenamiento de datos y otros componentes. Esta disposición es particularmente útil en el sistema de control de gotas, en el que el sistema informático está programado para hacer funcionar una interfaz de usuario de control de gotas. En esta disposición, el procesador del sistema informático puede admitir una entrada de datos a través de la interfaz de usuario y transmitir las instrucciones al controlador, por ejemplo, para activar/desactivar los electrodos, para leer los electrodos, la memoria y/o los sensores y similares.

En el sistema de ejecución de protocolo, un software para controlar el sistema puede cargarse directamente en y ejecutarse por el controlador para provocar que el controlador controle las funciones del sistema microaccionador de gotas. En esta realización, el sistema puede funcionar de forma autónoma, por ejemplo, como un sistema de mano o portátil.

#### 6.9.2 Microaccionador de Gotas

El sistema puede incluir un microaccionador de gotas 1804, como se describe adicionalmente en la Sección 6.8. El microaccionador de gotas está acoplado electrónicamente al procesador, de modo que el procesador puede controlar diversas operaciones del microaccionador de gotas, tales como operaciones de manipulación de gotas.

#### 6.9.3 Sensor

Diversas realizaciones de la invención hacen uso de sensores o detectores 1805. Los sensores pueden incluir sensores que están acoplados al microaccionador de gotas con el fin de medir parámetros de interés en el microaccionador de gotas, tales como la intensidad fluorescente o luminiscente en una localización en el microaccionador de gotas en la que puede localizarse un producto de reacción. Los sensores también pueden incluir sensores que controlen el estado del sistema, tales como sensores de inserción de microaccionadores de gotas, sensores de la sujeción de tapa, sensores de la temperatura ambiente y similares. La salida de cada sensor puede mapearse en una localización de memoria específica y el procesador sólo tiene que consultar la localización mapeada para obtener una lectura del sensor. El sensor se monta respecto al microaccionador de gotas y/o acoplado electrónicamente al microaccionador de gotas, de modo que el sensor puede detectar señales, tales como señales de luz o eléctricas, del microaccionador de gotas.

#### 6.9.4 Dispositivo o Dispositivos de Entrada y Salida

Los sistemas de la invención también incluyen diversos dispositivos de entrada 1806 y dispositivos de salida 1807. En ciertas realizaciones, tales como el sistema de ejecución de protocolo, ciertos dispositivos de entrada y salida pueden controlarse usando un controlador de interfaz hombre-máquina (HMI).

### 6.9.5 Software

Cada uno de los sistemas de la invención incluye un software. El software proporcionado en un medio de almacenamiento es un aspecto de la invención. Los ejemplos de medios de almacenamiento adecuados incluyen el almacenamiento magnético, almacenamiento óptico, memorias de cambio de fase, almacenamiento holográfico, almacenamiento de memoria molecular, SRAM respaldada por batería o condensador y almacenamiento de memoria *flash*. El software puede cargarse en una memoria y/o en un procesador. También es un aspecto de la invención un sistema en el que el software de la invención está presente en una memoria y/o un procesador y/o un medio de almacenamiento.

El software de la invención puede estar escrito en cualquiera de una diversidad de lenguajes de programación, tales como Visual C, Java y/o Python. El sistema puede incluir un intérprete para traducir la manipulación de gotas y otras instrucciones desde el lenguaje de alto nivel hasta un lenguaje intermedio para su ejecución por el procesador. Como alternativa, el software escrito de acuerdo con la invención puede compilarse en lenguaje de máquina usando un compilador. El intérprete del software y el compilador para el lenguaje de la invención son por sí mismos aspectos novedosos de la invención. Como tales, todas las formas de almacenamiento de datos, memorias y procesadores que contienen el intérprete y/o compilador son aspectos de la invención.

El sistema puede programarse para ejecutar una amplia diversidad de protocolos que impliquen cualquier cantidad de manipulaciones de gotas. Múltiples gotas pueden manipularse independientemente y simultáneamente en un solo microaccionador de gotas. La capacidad para manipular independientemente múltiples gotas en paralelo permite la ejecución de protocolos complejos como una serie de instrucciones microfluidas básicas. Los sistemas pueden aumentarse a escala y pueden controlar decenas, cientos, miles o más manipulaciones de gotas en paralelo por microaccionador de gotas. Por ejemplo, en cualquier momento, hasta un máximo de cada electrodo de control en el microaccionador de gotas puede engranarse en una operación de gotas.

El sistema puede programarse para permitir a los usuarios introducir instrucciones para la ejecución de protocolos. Los protocolos existentes pueden controlarse y ajustarse de acuerdo con las necesidades del usuario. Pueden ponerse en práctica protocolos complejos en los que el resultado de una o más etapas determina la selección de una o más etapas posteriores. Por ejemplo, una gota en la que un cierto resultado medido sea positivo puede transportarse para su procesamiento adicional, mientras que una gota en la que un resultado sea negativo puede desecharse o viceversa.

### 6.9.6 Portabilidad

Respecto a las Figuras 10A y 10B, en algunas realizaciones, el analizador se proporciona como un dispositivo portátil, tal como un dispositivo de mano 1900. La Figura 10A muestra el exterior del dispositivo de mano 1900 y la Figura 10B muestra una ranura 1902 para la inserción de un microaccionador de gotas (no se muestra), un sensor óptico 1904 para detectar señales ópticas del microaccionador de gotas y una sujeción de tapa 1906, que puede acoplarse al sistema para indicar si la tapa está abierta o cerrada. Se prevé que el analizador portátil también pueda ser un dispositivo de sobremesa. La portabilidad de los sistemas microaccionadores de gotas de la invención facilita el uso en el punto de asistencia o en el punto de recogida de muestra en una amplia diversidad de entornos clínicos, quirófanos, salas de urgencias, laboratorios pequeños y en el campo (equipos de respuesta de emergencia, accidentes, desastres, campos de batalla, sitios de bioterrorismo, etc.) para un diagnóstico rápido, que puede conducir a darle la vuelta a los tiempos rápidamente en situaciones críticas.

### 6.10 Interfaz de Usuario

El sistema control de gotas incluye un software de control de gotas programado para desplegar una interfaz de control de gotas para controlar las operaciones de gotas en el microaccionador de gotas, controlar el sensor, cuando está presente, y controlar otro hardware asociado con el sistema de control de gotas. El sistema también puede incluir un software para facilitar la creación de un conjunto de software o instrucciones utilizables por ordenador para controlar las funciones del sistema microaccionador de gotas, tales como operaciones de gotas y/o operaciones de sensores.

#### 6.10.1 Sistema de Ejecución de Protocolo e Interfaz de Usuario

La invención proporciona un sistema de ejecución de protocolo. El sistema de ejecución de protocolo incluye un software de ejecución de protocolo programado para facilitar la ejecución de un conjunto de instrucciones de software para cargar fluido, controlar operaciones de gotas en el microaccionador de gotas y/o otras funciones de un microaccionador de gotas y del hardware relacionado. El sistema de ejecución de protocolo proporciona la capacidad de ejecutar protocolos en un sistema independiente, típicamente un sistema de mano o portátil.

El sistema de ejecución de protocolo está configurado para controlar el microaccionador de gotas y cualquier componente asociado. Pueden cargarse instrucciones preprogramadas en el controlador que controla el sistema y cualquier componente asociado. El sistema de ejecución de protocolo puede incluir diversos componentes para permitir a un usuario proporcionar una entrada de datos y obtener un resultado del procesador. La interfaz hombre-máquina puede facilitarse usando una tarjeta HMI. La tarjeta HMI incluye típicamente un controlador y diversos componentes electrónicos, tales como buses y puertos para acoplar electrónicamente dispositivos de entrada y salida con el procesador.

### 6.11 Observaciones Finales

La descripción detallada anterior de realizaciones se refiere a los dibujos adjuntos, que ilustran realizaciones específicas de la invención. Otras realizaciones que tengan estructuras y funcionamientos diferentes no se alejan del ámbito de la presente invención.

Como apreciará un experto en la materia, la presente invención puede incorporarse como un procedimiento, sistema o producto de programa informático. Por consiguiente, la presente invención puede adoptar la forma de una realización totalmente de hardware, una realización totalmente de software (incluyendo firmware, software residente, microcódigo, etc.) o una realización que combine aspectos de software y hardware que pueden denominarse todos en general en el presente documento "circuito", "módulo" o "sistema". Además, la presente invención puede adoptar la forma de un producto de programa informático en un medio de almacenamiento utilizable por ordenador que tiene un código de programa utilizable por ordenador incorporado en el medio.

Puede utilizarse cualquier medio utilizable por ordenador adecuado. El medio utilizable por ordenador o legible por ordenador puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, un sistema, aparato, dispositivo o medio de propagación electrónico, magnético, óptico, electromagnético, de infrarrojos o semiconductor. Los ejemplos más específicos (una lista no exhaustiva) del medio legible por ordenador incluirían algunos o todos los siguientes: una conexión eléctrica que tiene uno o más cables, un disquete de ordenador portátil, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de sólo lectura (ROM), una memoria de sólo lectura programable borrable (EPROM o memoria Flash), una fibra óptica, una memoria de sólo lectura de disco compacto portátil (CD-ROM), un dispositivo de almacenamiento óptico, un medio de transmisión tal como los que sirven de soporte a Internet o a una intranet, un dispositivo de almacenamiento magnético. Obsérvese que el medio utilizable por ordenador o legible por ordenador puede incluso ser papel u otro medio adecuado en el que se imprima el programa, ya que el programa puede capturarse electrónicamente, por ejemplo, por escaneo óptico del papel u otro medio, después compilarse, interpretarse o procesarse de otro modo de una forma adecuada, si es necesario, y después almacenarse en la memoria de un ordenador. En el contexto del presente documento, un medio utilizable por ordenador o legible por ordenador puede ser cualquier medio que pueda contener, almacenar, comunicar, propagar o transportar el programa para su uso mediante o en relación con el sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

El código del programa informático para llevar a cabo las operaciones de la presente invención puede estar escrito en un lenguaje de programación orientado a objetos tal como Java, Smalltalk, C++ o similares. Sin embargo, el código del programa informático para llevar a cabo las operaciones de la presente invención también puede estar escrito en lenguajes de programación de procedimiento convencionales, tales como el lenguaje de programación "C" o lenguajes de programación similares. El código de programa puede ejecutarse en su totalidad en el ordenador del usuario, parcialmente en el ordenador del usuario, como un paquete informático autónomo, parcialmente en el ordenador del usuario y parcialmente en un ordenador remoto, o en su totalidad en el ordenador o servidor remoto. En el último caso, el ordenador remoto puede conectarse al ordenador del usuario a través de una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN), o la conexión puede realizarse con un ordenador externo (por ejemplo, a través de Internet usando un Proveedor de Servicios de Internet).

La presente invención se describe con referencia a ilustraciones de diagramas de flujo y/o diagramas de bloques de procedimientos, aparatos (sistemas) y productos de programas informáticos de acuerdo con realizaciones de la invención. Se entenderá que cada bloque de las ilustraciones de diagramas de flujo y/o diagramas de bloques, y combinaciones de bloques en las ilustraciones de diagramas de flujo y/o diagramas de bloques, puede ponerse en práctica mediante instrucciones de programa informático. Estas instrucciones de programa informático pueden proporcionarse a un procesador de un ordenador con fines generales, ordenador con fines especiales u otro aparato de procesamiento de datos programable para producir una máquina, de modo que las instrucciones, que se ejecutan a través del procesador del ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable, cree medios para poner en práctica las funciones/actos especificados en el bloque o bloques del diagrama de flujo y/o diagrama de bloques.

Estas instrucciones de programa informático también pueden almacenarse en una memoria legible por ordenador que puede dirigirse a un ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para que funcione de una forma particular, de modo que las instrucciones almacenadas en la memoria legible por ordenador produzcan un artículo de fabricación que incluye medios de instrucciones que ponen en práctica la función/acto especificado en el bloque o bloques del diagrama de flujo y/o diagrama de bloques.

5

Las instrucciones de programa informático también pueden cargarse en un ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para provocar que se realicen una serie de etapas funcionales en el ordenador u otro aparato programable para producir un procedimiento aplicado informáticamente, de modo que las instrucciones que se ejecuten en el ordenador u otro aparato programable proporcionen etapas para aplicar las funciones/actos especificados en el bloque o bloques del diagrama de flujo y/o diagrama de bloques.

10

La presente memoria descriptiva está dividida en secciones por comodidad del lector únicamente. Los encabezados no deberían interpretarse como limitantes del ámbito de la invención.

15

Se entenderá que diversos detalles de la presente invención pueden cambiarse sin alejarse del ámbito de la presente invención. Además, la descripción anterior es con fines ilustrativos solamente y no con el fin de limitar, ya que la presente invención se define por las reivindicaciones que se exponen a continuación en el presente documento.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para proporcionar una gota en contacto con una superficie de una o más perlas magnéticamente sensibles (1102, 1207, 1305) comprendidas en la gota en un microaccionador de gotas, con una concentración reducida de la sustancia, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) proporcionar un microaccionador de gotas que comprende dicha superficie de una o más perlas magnéticamente sensibles en contacto con la gota (1101, 1206), comprendiendo la gota una concentración de partida y una cantidad de partida de una sustancia (1103, 1208, 1306) y teniendo un volumen de partida;
- 10 (b) realizar una o más operaciones de gotas para unir una gota de lavado (1106, 1205) con la gota (1101, 1206) proporcionada en la etapa (a) para dar una gota combinada (1307); y
- (c) inmovilizar la una o más perlas magnéticamente sensibles por exposición de dicha una o más perlas magnéticamente sensibles a un campo magnético;
- caracterizado porque** mientras que dichas una o más perlas magnéticamente sensibles están así inmovilizadas, dicho procedimiento incluye además la etapa de:
- 15 (d) realizar una o más operaciones de gotas mediadas por electrohumectación para dividir la gota combinada para dar un conjunto de gotas que comprende:
- (i) una gota (1108, 1212) en contacto con dicha superficie de una o más perlas magnéticamente sensibles que tiene una concentración disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida; y
- 20 (ii) una gota (1110, 1214) que está separada de dicha superficie de una o más perlas magnéticamente sensibles.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además liberar o resuspender una o más de las perlas después de la etapa (d) de la reivindicación 1.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende situar la gota (1101, 1206) que comprende las perlas magnéticamente sensibles en proximidad a un medio (1104, 1204, 1304) para lograr un campo magnético en proximidad a uno o más electrodos, en el que la intensidad y la proximidad del campo magnético son suficientes para inmovilizar perlas magnéticamente sensibles durante la ejecución de un protocolo de lavado.
- 25
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (d) produce un conjunto de gotas que comprende:
- 30 (a) una gota (1108, 1212) que comprende sustancialmente todas las perlas y que tiene una concentración disminuida de la sustancia respecto a la concentración de partida; y
- (b) una gota (1110, 1214) que carece sustancialmente de las perlas.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la gota (1108, 1212) de la etapa (d)(i) comprende más del 99% de las perlas presentes en la gota combinada.
- 35
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la gota (1108, 1212) de la etapa (d)(i) comprende más del 99,999% de las perlas presentes en la gota combinada.

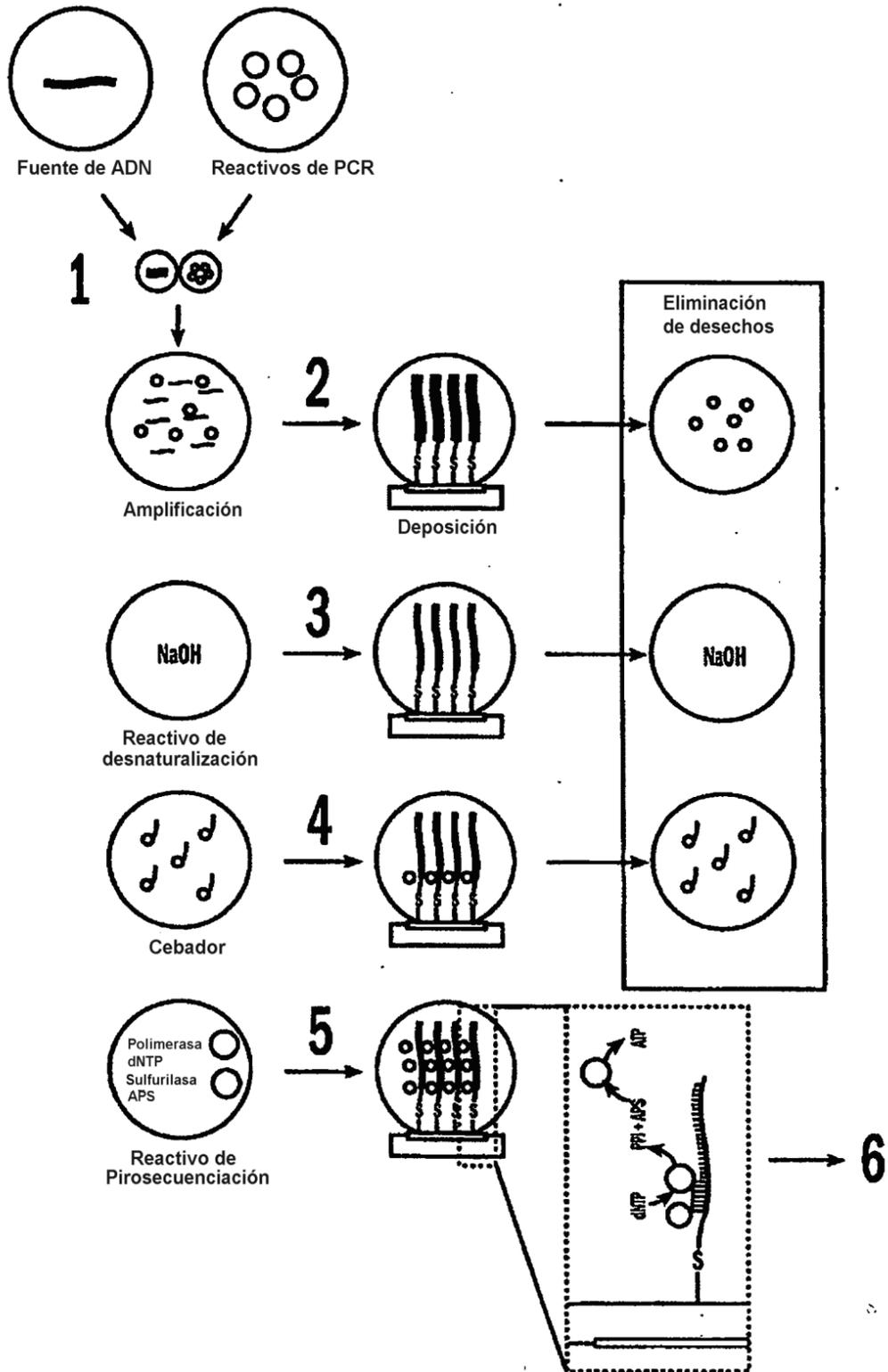
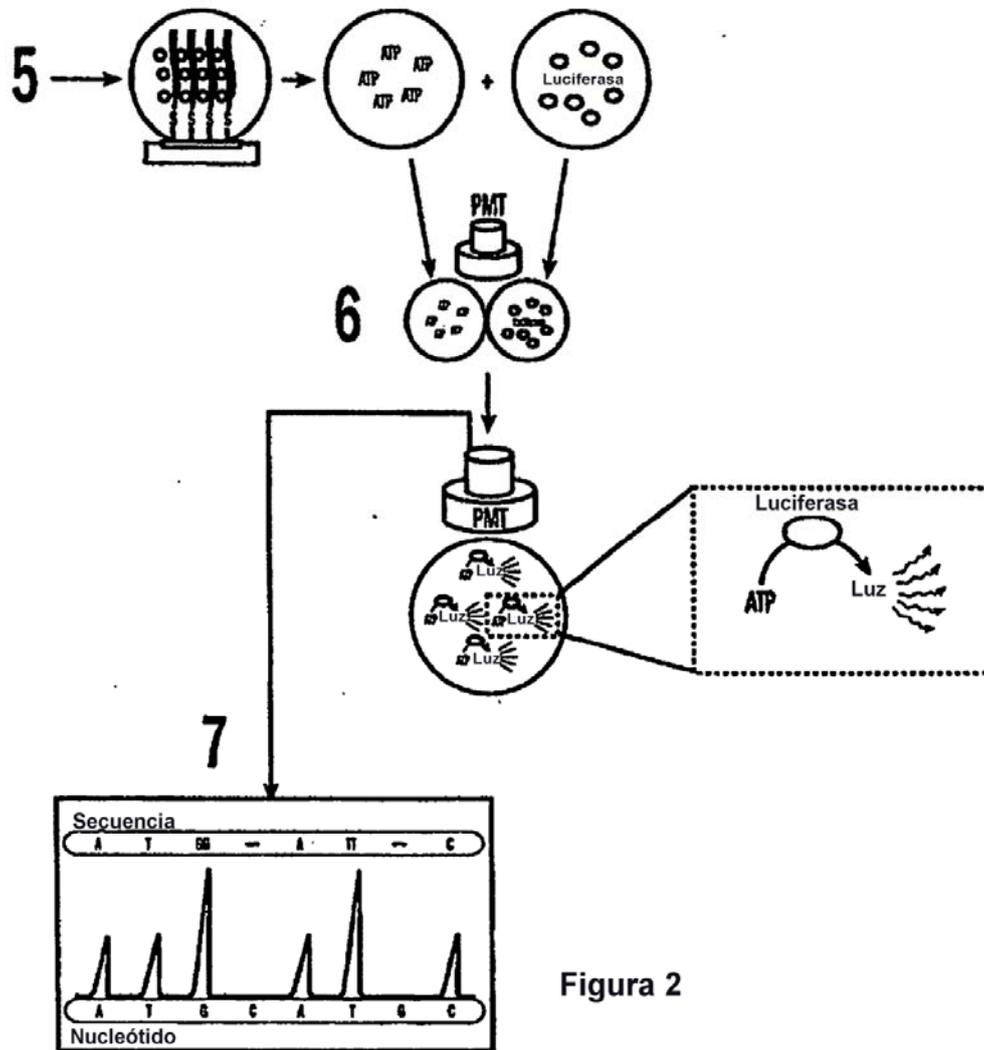


FIGURA 1





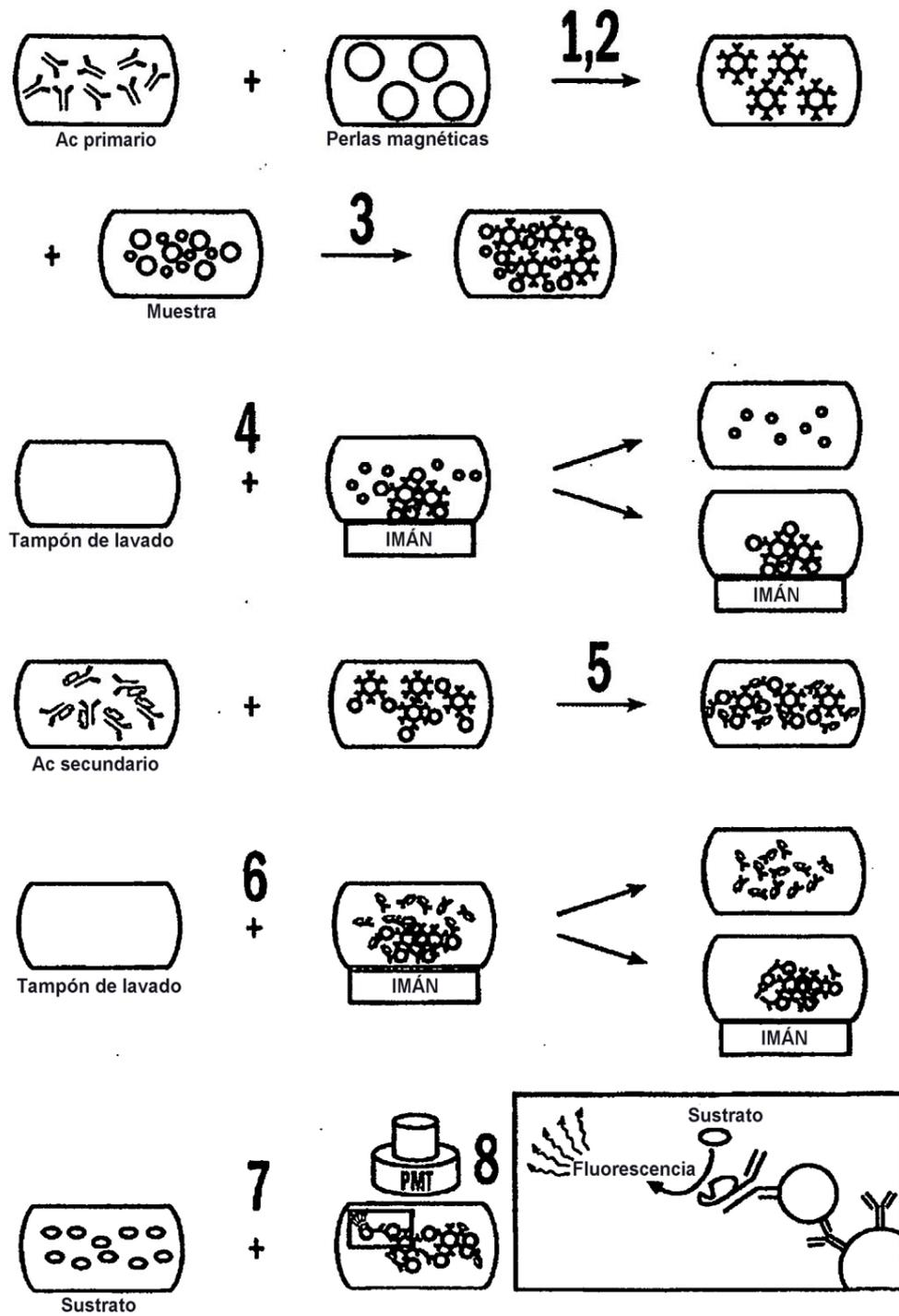


Figura 4

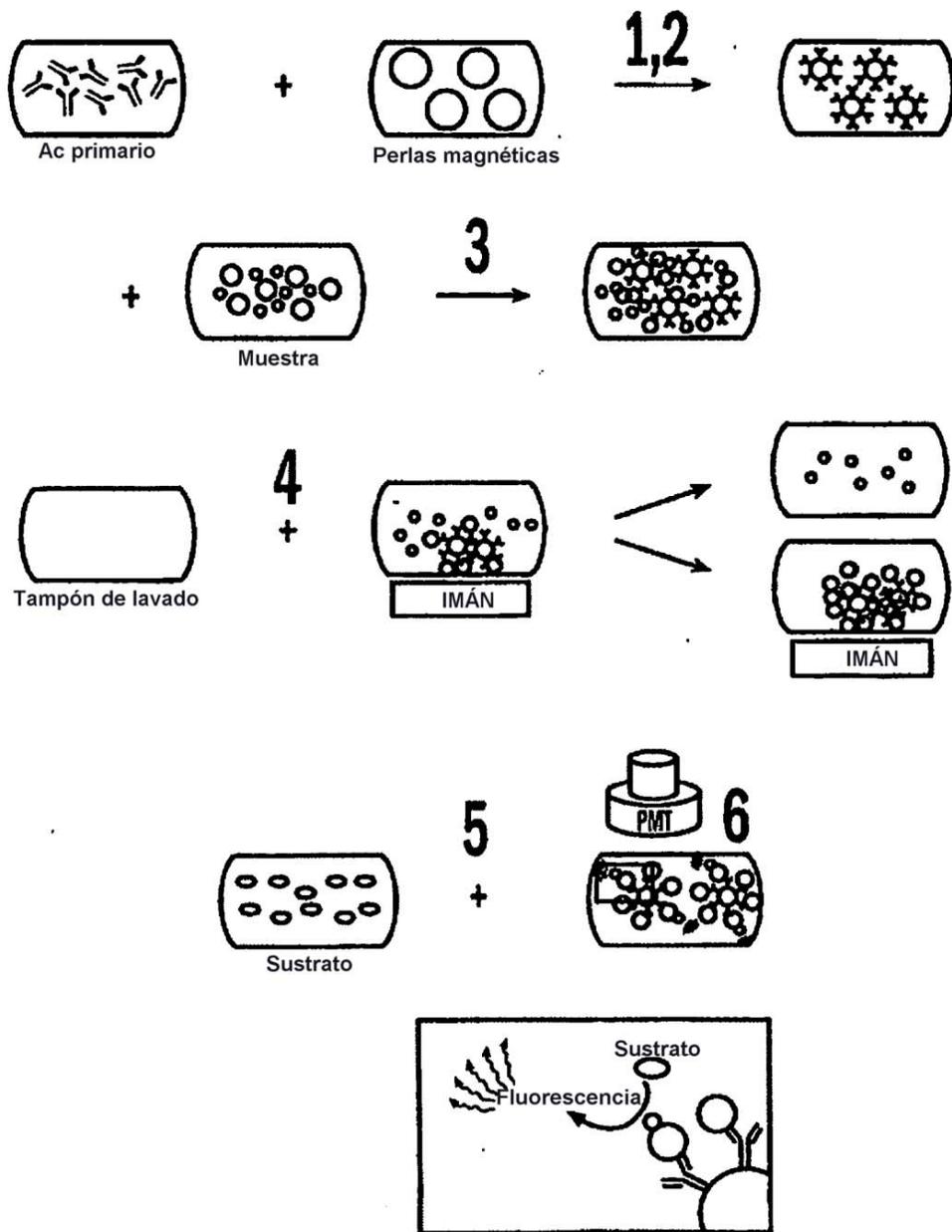


FIGURA 5

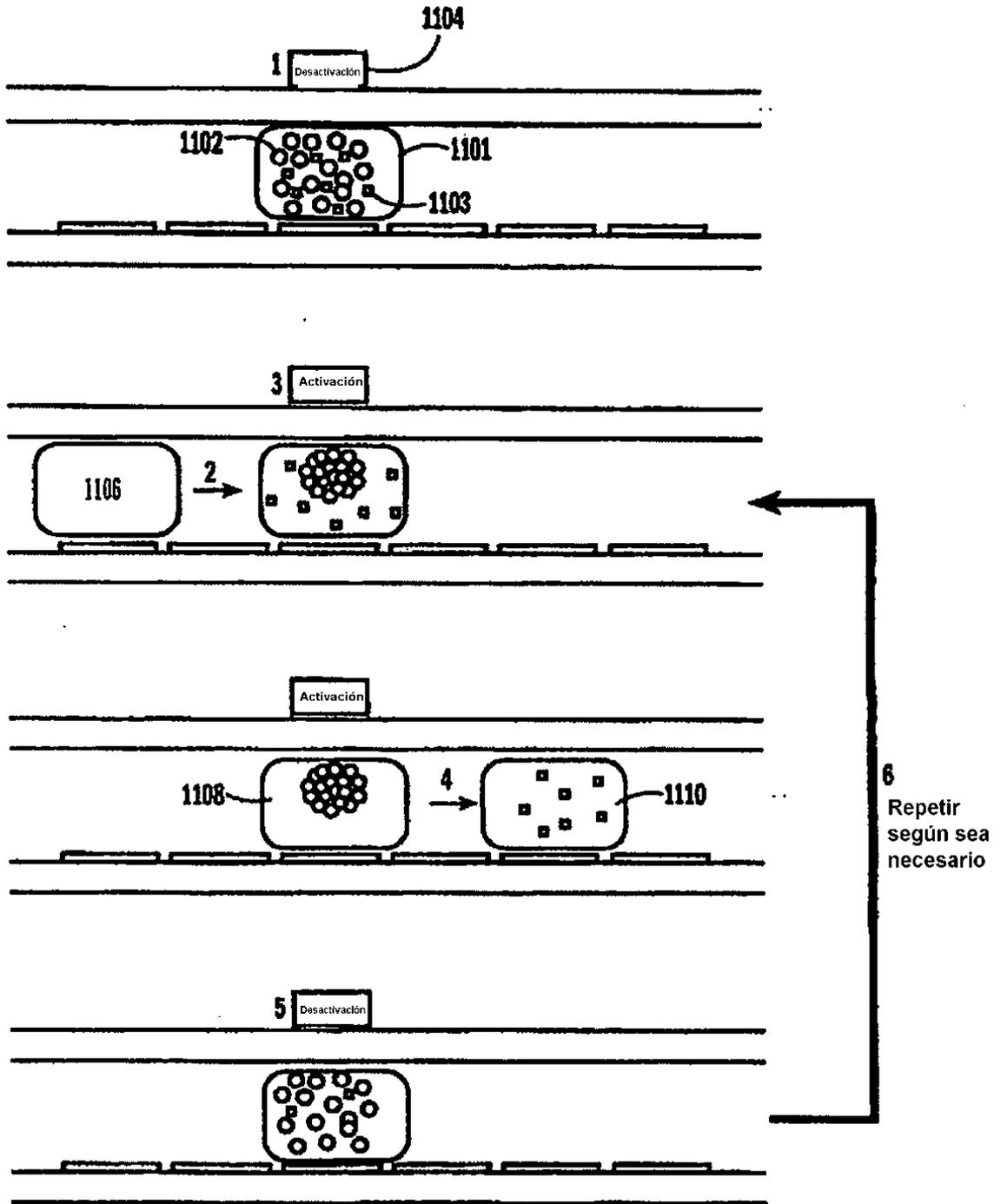


FIGURA 6

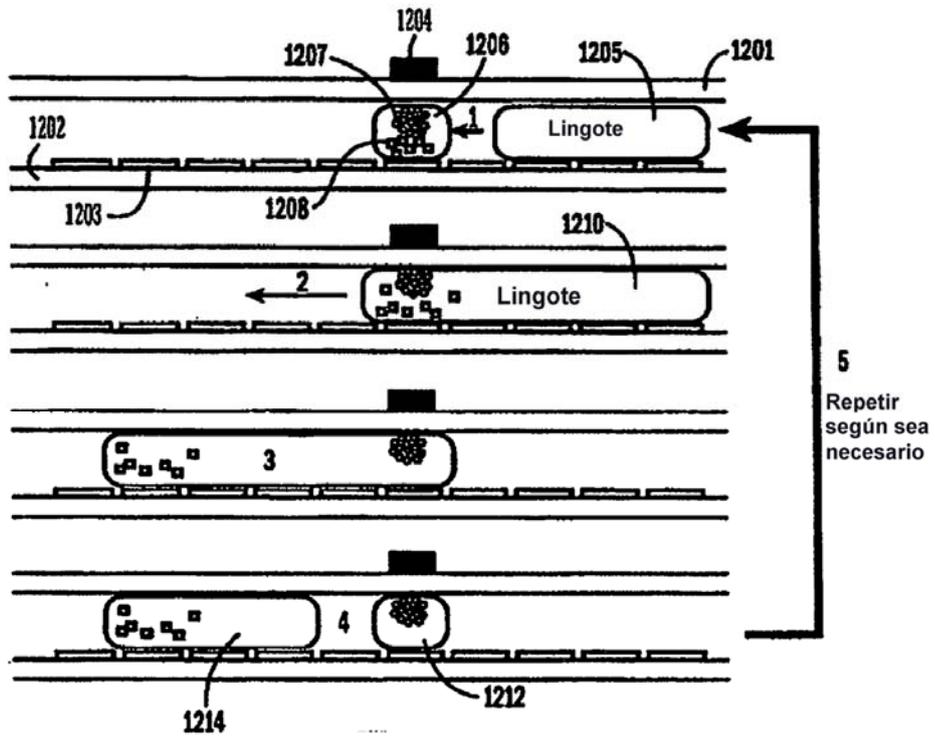


Figura 7

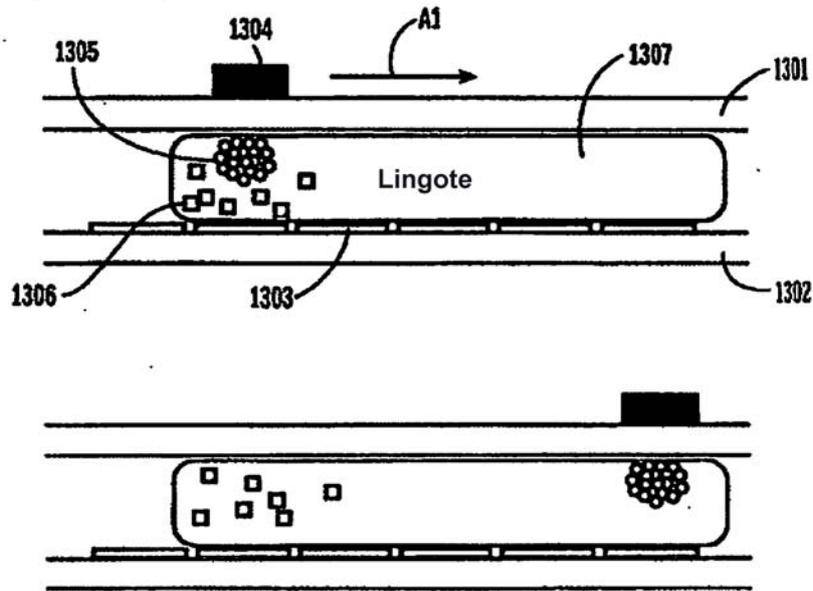


Figura 8

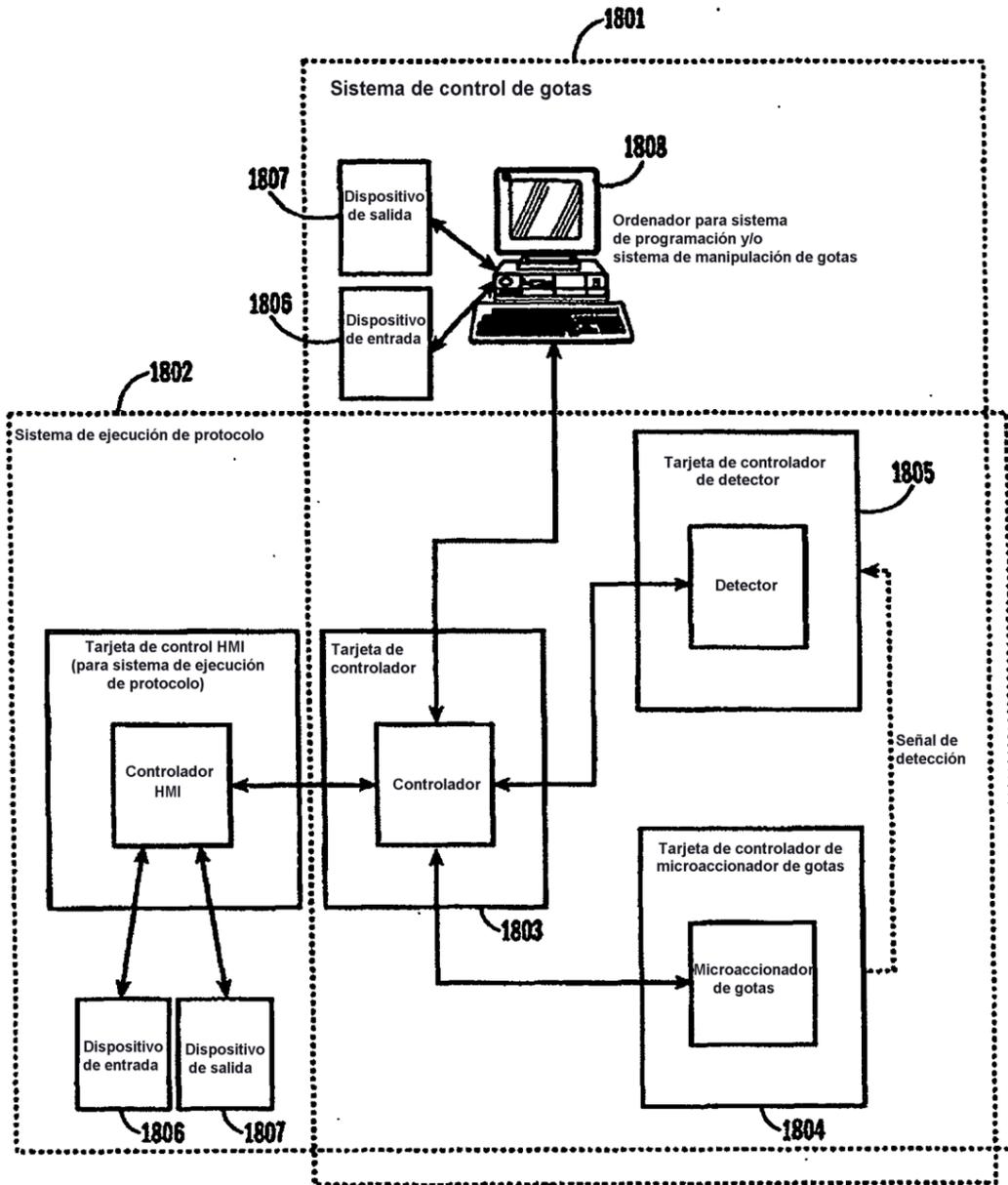


Figura 9

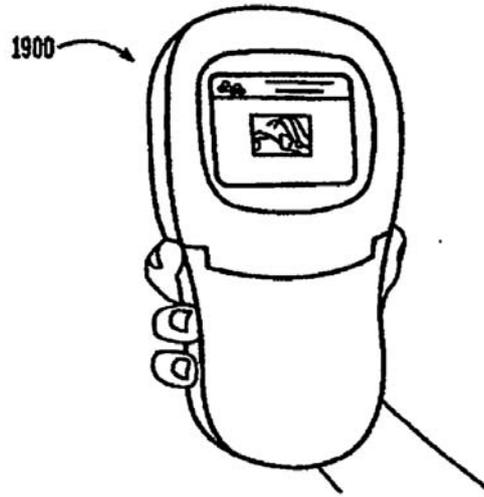


Figura 10A

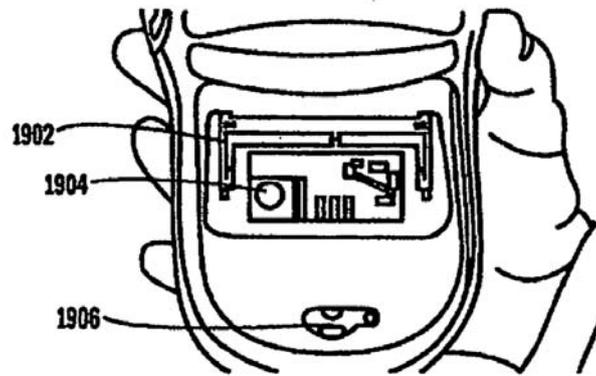


Figura 10B