

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 270**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2010 PCT/EP2010/052849**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100265**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10707275 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2403961**

54 Título: **Dispositivo y método de producción de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, y aplicaciones de los mismos**

30 Prioridad:

**06.03.2009 DE 102009012169**

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

**11.10.2017**

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG  
(100.0%)  
Fahnenbergplatz  
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**ZENGERLE, ROLAND;  
VON STETTEN, FELIX;  
ROTH, GÜNTER y  
HOFFMANN, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 637 270 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método de producción de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, y aplicaciones de los mismos

5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos de producción de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, tales como biomoléculas o moléculas químicamente producidas, y, en particular, a tales métodos y dispositivos que son adecuados para producir un duplicado o derivado de una micromatriz de dichas moléculas y/o moléculas derivadas de la misma, tal como de una micromatriz de ADN, micromatriz de ARN o micromatriz de proteína, y a la aplicación de la matriz para identificar secuencias de ADN asociadas a reacciones que implican secuencias primarias, copias de las mismas o derivados de las mismas.

10 Se entiende que una micromatriz significa una disposición de muchas biomoléculas diferentes sobre o en una superficie en puntos individuales. Dichos puntos también se denominan manchas y normalmente tienen un diámetro que oscila de 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ . Una o varias poblaciones idénticas de biomoléculas están presentes dentro de una mancha. Excepto por algunas redundancias intencionadas, las diversas manchas, sin embargo, representan diferentes biomoléculas. Las biomoléculas pueden depositarse sobre la superficie, pueden existir en una capa sobre la superficie, pueden existir dentro de una cavidad, o pueden existir en un modo inmovilizado sobre o en una partícula, siendo posible que las partículas se dispongan como una matriz.

20 Convencionalmente, ha habido diversas técnicas de producción de micromatrices. Según una técnica, las biomoléculas se sintetizan directamente sobre la superficie (síntesis *in situ*), por ejemplo usando síntesis de luz, síntesis química, síntesis en mancha, un proceso de impresión, y similares. Una técnica de síntesis de luz tal se emplea, por ejemplo, por Affymetrix, la síntesis en mancha se realiza por Agilent. Combimatrix produce micromatrices de ADN por medio de compartimentos de reacción electrónicamente direccionables virtuales. Según una técnica adicional, la(s) (bio)molécula(s) son al principio sintetizadas y posteriormente se depositan sobre la superficie como una matriz dispuesta, siendo una técnica tal empleada, por ejemplo, por Agilent, Gesim y Biofluidix. Ambas técnicas requieren un alto nivel de gasto técnico. Dicho gasto técnico aumenta más de linealmente a medida que aumenta el número de diferentes biomoléculas y a medida que disminuyen los diámetros de los puntos de deposición. Además, la cantidad de tiempo implicada, además de los costes, aumentan significativamente cuando una micromatriz tal va a contener, por ejemplo, dos veces más sustancias, o si el tamaño de las estructuras recubiertas, es decir, manchas, va a reducirse. Una técnica de estampado para producir micromatrices se describe en [1].

30 Por medio de la síntesis en el sitio sobre una matriz, es posible producir millones de secuencias de ADN diferentes. Sin embargo, con el fin de lograr una nueva disposición o un tamaño de patrón diferente, es necesario reorganizar el proceso de fabricación entero. Esto requerirá entonces nuevas configuraciones del instrumento y, en el caso de la síntesis ayudada por luz, incluso nuevas máscaras de fotolitografía o reprogramación del sistema de espejos digital, véase [2], donde se describe la utilización de espejos digitales para crear una micromatriz. Esto se evita en la medida de lo posible con el fin de mantener los costes bajos.

40 Por falta de tiempo solo no es posible transferir más de algunas decenas de miles de sustancias por medio de síntesis en el laboratorio y por medio de la posterior transmisión a una micromatriz, por ejemplo por medio de un nanoplotter. Se requerirían semanas o meses para producir un número apreciable de puntos sobre una micromatriz con un millón de biomoléculas diferentes. Durante ese tiempo la química superficial cambiará y la micromatriz completa no funcionará más.

Por tanto, sería deseable un método por medio del cual fuera posible copiar, de un modo simple y económico, micromatrices existentes, es decir, una disposición regular de biomoléculas conocidas que son complicadas y caras de producir.

45 Algunas ideas básicas sobre esa cuestión ya han sido presentadas, [3] y [4]. [3] y [4] desvelan un método de replicación de una matriz de oligonucleótidos en la que uno o más oligonucleótidos funcionalizados con biotina se hibridan en uno o más oligonucleótidos y se amplifican en un primer sustrato. Los oligonucleótidos funcionalizados con biotina y amplificados se anclan entonces a un segundo sustrato con estreptavidina. Los oligonucleótidos funcionalizados con biotina pueden separarse de los oligonucleótidos por fuerza mecánica para crear una matriz duplicada. Sin embargo, tales procesos de copia son caros y requieren un sistema de anclaje bioquímico adicional y en muchos casos solo podrían producir una copia negativa de la micromatriz de ADN original.

50 [5] también describe la copia de una matriz de ADN usando un sistema de estreptavidina/biotina. [6] describe cómo el ADN puede ser copiado en ARN.

55 Durante aproximadamente 30 años, el ADN ha sido amplificado en el laboratorio. Entre otras, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha llegado a casi todos los laboratorios como una técnica estándar, y es la base de la mayoría de los estudios genéticos. Sin embargo, también hay otras técnicas que permiten que el ADN se multiplique, por ejemplo NASBA, amplificación por recombinasa polimerasa, amplificación por círculo rodante, y diversas otras técnicas de amplificación isotérmica.

No solo dichas técnicas permiten generalmente al ADN multiplicarse, sino que también permiten la multiplicación dirigida de áreas de ADN individuales o subconjuntos del ADN. Por medio de selección específica de los puntos de partida (cebadores), también es posible multiplicar específicamente áreas individuales del ADN. La mayoría de los procesos de amplificación de ADN tienen lugar en disolución, y esto se denomina una reacción en fase líquida. Sin embargo, en los últimos años, han surgido varios métodos que utilizan una fase sólida adicional para la amplificación de ADN y en el proceso enriquecen el mismo en dicha fase sólida. Por ejemplo, la reacción de extensión de cebadores en portaobjetos o fase sólida [9,10]. A continuación, se describirán dos de los métodos más comunes, las bases de la amplificación en puente de ADN, además de la PCR de emulsión de agua en aceite.

Amplificación en puente de ADN: para la amplificación en puente, el ADN (parcialmente desconocido) se extiende inicialmente, en ambos extremos, con las denominadas secuencias adaptadoras conocidas. Dichas extensiones sirven de sitios de unión para secuencias complementarias sobre la superficie. Es solo después de que haya tenido lugar la unión a la superficie que, después, se producirá la amplificación. La hebra de ADN que se ha copiado y, así, recientemente creada, se une ahora de forma fija (covalentemente) a la superficie, y tiene un sitio de unión adicional en su extremo no unido. Dicho sitio de unión adicional puede ahora también unirse a un homólogo adecuado sobre la superficie y empezar una amplificación adicional, que a su vez creará una nueva hebra de ADN unida en un extremo y que tiene la secuencia de unión original en el otro extremo libre. De este modo, cada vez se generan más hebras nuevas, de una manera exponencial, que se unen de forma fija en un extremo, y cuyo otro extremo permite la unión temporal a la superficie. Durante la amplificación, la hebra original se une de forma fija (covalentemente) en un extremo, y se une de forma suelta (no covalentemente) en el otro extremo, y así genera un puente molecular. A este respecto, [11] generalmente describe la amplificación en puente, y [12] describe la utilización de la amplificación en puente para la secuenciación.

Para una PCR de emulsión de agua en aceite, se emplea un tipo de amplificación en puente. Esto implica extender inicialmente las hebras de ADN en ambos lados por medio de secuencias adaptadoras, como para la amplificación en puente. Posteriormente, el ADN extendido se mezcla junto con una mezcla de PCR acuosa y partículas en fase sólida - también denominadas perlas - y se emulsiona en aceite, de manera que resulta una emulsión de agua y partículas en aceite. Para esta emulsión de agua en aceite, las concentraciones están seleccionadas de forma que idealmente, exactamente una hebra de ADN y precisamente una partícula quedará atrapada dentro de cada gotita de agua. Según la amplificación en puente, la superficie de la partícula contiene secuencias que permiten que una copia de ADN se una covalentemente a ésta. De este modo, la partícula entera puede cubrirse con copias del ADN original por medio de amplificación. Esta técnica se usa principalmente en secuenciadores. En esta técnica, solo una única hebra definida se amplifica, en cualquier momento, sobre la fase sólida o fase líquida.

En la amplificación de proteínas, o síntesis de proteínas, hay una hebra de ADN que puede transcribirse básicamente inicialmente en ARN y luego en una proteína por medio de un sistema bioquímico adecuado. Si el ARN es suficientemente estable, o si hay un número suficiente de moldes de ADN, puede producirse un gran número de proteínas. Esta técnica se corresponde con el proceso natural que se produce dentro de una célula que implica crear proteínas de ADN mediante ARN, y es la base y el paradigma central de la bioquímica. Como recientemente, han estado disponibles sistemas bioquímicos simplificados que son capaces de controlar este complejo de tareas y así permitir producir, al menos en principio, una proteína de una hebra de ADN en el laboratorio. A este respecto, [7] describe un método de producción directa de una micromatriz de proteína de una micromatriz de ADN, y [8] describe un método de producción de una micromatriz de proteína con anclajes de ADNc. Alternativamente, la amplificación de proteína también puede realizarse usando células procariontas o eucariotas que tienen ADN que codifica proteína introducida en ellas.

Para decodificar una secuencia de ADN, se emplean los denominados métodos de secuenciación, una visión general de métodos de secuenciación relativamente recientes que se proporciona en [13]. Además, métodos de secuenciación en los que el ADN se une a partículas se describen en [14].

Las máquinas altamente complejas usadas para la secuenciación emplean una multiplicidad de etapas de reacción y técnicas para atrapar inicialmente el ADN que ha sido aislado, para multiplicarlo y para posteriormente leerlo elemento estructural por elemento estructural. Por medio de la química de reacción seleccionada y el método de secuenciación, es posible, por medio de caros métodos de bioinformática, recalcular la secuencia de ADN en conjunto, y así obtener el genoma de la especie estudiada.

Técnicas de secuenciación previas incluyeron el fraccionamiento de ADN dentro de un gel. Esto era un enfoque no basado en fases sólidas y se llama secuenciación de Sanger. Con los secuenciadores de la generación más reciente, funciona con una PCR de emulsión de agua en aceite y así genera millones de partículas, por ejemplo perlas, que llevan muchas copias idénticas de diferentes fragmentos de ADN, respectivamente. Para leer la secuencia, las partículas están dispuestas, por ejemplo, en un denominado PicoTiterPlate™ que tiene, por ejemplo, 1,3 a 3,4 millones de diferentes microcavidades, y se inmovilizan. Esto ya representa una micromatriz como tal. A este respecto, refiérase por favor a [15], donde se describe la utilización de amplificación en puente para la secuenciación.

Incluso si ya se ha producido una disposición regular de biomoléculas de este modo, sin embargo, no puede usarse como una micromatriz convencional con secuencias conocidas, ya que las secuencias individuales de las

biomoléculas unidas a las partículas todavía no son en sí conocidas. Sin embargo, después de la secuenciación, la secuencia del fragmento de ADN unida a una partícula específica será en sí conocida.

5 Ya se han hecho esfuerzos para recuperar las partículas individuales y reutilizarlas como una matriz, por ejemplo por parte de Scineon junto con el Max-Planck-Institut für molekulare Genetik [*Instituto Max-Planck de Genética Molecular*] en Berlín. Sin embargo, este método es caro y permite producir solo un espécimen de una matriz tal.

10 La litografía blanda, o impresión de microcontacto, es una técnica de estampado que permite depositar moléculas sobre una superficie y posteriormente transferir las mismas a otra superficie. También permite integrar cavidades pequeñas o microfluídicas y así proporcionar circuitos complejos para líquidos. Dichos circuitos permiten tratar superficies de una manera específica y así recubrir o modificar estructuras extremadamente pequeñas. El material usado para este fin es una silicona (PDMS). Por medio de modificación superficial adecuada de PDMS, pueden añadirse diversas biomoléculas a la superficie, y así transferirse después. Pueden transferirse tanto ADN como ARN, además de biomoléculas.

Estas propiedades de transferencia pueden ser explotadas, entre otras cosas, para una etapa de copia, siendo [16] la primera en describir cómo las biomoléculas pueden transferirse usando litografía blanda.

15 Las matrices de ADN, o micromatrices de ADN, se usan principalmente para el denominado análisis de expresión, secuenciación y cantidad de genes o análisis de SNP.

20 En el análisis de expresión, se desea estudiar el nivel de actividad de genes específicos. Se considera que el ARNm es un marcador para este fin. Para este fin, se estimulan células o seres vivos, por ejemplo administrando un fármaco, que cambia los factores medioambientales, poniéndolos bajo estrés, y similares. A partir del material biológico, se recoge inicialmente el ARNm, se transcribe en un denominado ADN complementario (ADNc), y se provee de un colorante. Una muestra de referencia está provista de un colorante diferente. Principalmente se usan colorantes verde y rojo. Se mezclan proporciones iguales de las muestras juntas y entonces se aplican a la micromatriz. Si está contenida una secuencia de ADN específica, en concentraciones iguales, en ambas muestras originales, se unirán moléculas complementarias de ambas muestras, en concentraciones iguales, a la mancha respectiva de la micromatriz. La lectura de la mancha, por tanto, produce un color secundario. En el caso de verde y rojo, resultará amarillo. Si hay proporciones desiguales de la misma secuencia de genes, la mancha correspondiente sobre la micromatriz comprenderá un color secundario cuya coloración representará el producto génico predominante. Genes que son completamente encendidos o apagados tendrán solo un tono o el otro. El patrón de color permite deducir la cantidad de ARNm y proporciona una pista sobre cómo de fuerte los genes específicos han sido activados o desactivados por las influencias estudiadas. [17] desvela la aplicación de perfilado de expresión para estudios de genoma completo por medio de secuenciaciones altamente paralelas.

35 En análisis de SNP, se investiga si las secuencias de genes comprenden mutaciones individuales, es decir, secuencias que son idénticas, excepto por un par de bases (sustitución de pares de bases individuales = polimorfismo de un solo nucleótido). La localización precisa del par de bases sustituido especifica si la sustitución no tiene efecto o solo efectos menores sobre el organismo, o si esto es un defecto génico letal. En el caso de varias enfermedades hereditarias graves tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, se conocen tales SNP graves. Con muchos otros SNP, pueden deducirse riesgos elevados o susceptibilidades a enfermedades específicas tales como, por ejemplo, diabetes o raquitismo. Para análisis de SNP, el ADN se recoge directamente del material biológico y se marca con un colorante. Para cada SNP, hay cuatro manchas sobre la micromatriz, que se diferencian, en la misma posición en cada caso, por un par de bases. A partir de la base de la posición de unión puede especificarse qué base está en la posición relevante en la muestra desconocida, véase [17].

45 Con matrices de proteína, la producción sola es considerablemente más difícil, ya que a diferencia del ADN, las proteínas tienen un espectro enormemente ancho de solubilidades, reactividades y especificidades. Por tanto, no es trivial unir diversas proteínas sobre una superficie usando el mismo anclaje químico. Normalmente, las matrices de proteína contienen varios cientos a miles de proteínas diferentes. Se emplean predominantemente matrices de proteína para estudios de unión. Éstos comprenden poner una molécula marcada sobre la matriz de proteína. Tales manchas sobre la micromatriz que comprenden coloración son, por tanto, posibles componentes de unión para la molécula estudiada. Esta técnica se emplea, entre otras cosas, para el mapeo de epítopes con el fin de encontrar específicamente sitios de unión.

La arquitectura de una micromatriz como tal se describe en [18].

Las aplicaciones de micromatrices son, por tanto, de amplio alcance y variadas. Sin embargo, debido a la falta de recursos financieros necesarios, o debido a su relación coste-beneficio, están considerablemente limitadas en su uso.

55 Las secuencias de ADN contienen información bioquímica y pueden multiplicarse por medio de un sistema de replicación bioquímico. Ya se han perseguido diversos enfoques para copiar secuencias de ADN, a partir de copia de los pares de bases individuales sobre una superficie, hasta el enfoque descrito en [4], [5] y [6], que expone cómo puede copiarse ADN, en principio, de una superficie a otra.

Por tanto, un artículo [7] ha sido recientemente publicado sobre cómo puede prepararse una copia de proteína a partir de una matriz de ADN.

5 Las ilustraciones anteriores muestran que el estado de la técnica permite dos técnicas fundamentales de producción de micromatrices, concretamente producir directamente sustancias en el sitio, por una parte, y transferir las sustancias, después de una síntesis, por medio de un proceso de dispensación o impresión microscópica, por otra parte. Cada una de estas técnicas es técnicamente compleja e implica un alto gasto en términos de tiempo y coste, siendo la regla general que a medida que se duplica el número de sustancias, el tiempo y el coste requeridos también se duplicará al menos. Además, es esencial tener conocimiento preciso de la información bioquímica - en el caso de matrices de ADN, de la secuencia - antes de la síntesis. Para obtener dicha información en el caso de ADN, se usan los denominados secuenciadores, como se ha explicado anteriormente. Hasta la fecha no se ha conocido o establecido cadena de producción directa entre la secuenciación y la fabricación de micromatrices. Esto significa que un organismo desconocido debe secuenciarse inicialmente, tras lo cual la secuencia se calcula a partir de los datos del secuenciador, y posteriormente se produce una matriz. Por medio de esta matriz puede entonces estudiarse inmediatamente un patrón de expresión. Además, es conocido producir matrices de proteína a partir de secuencias conocidas. Esta cadena de producción es muy prolongada y cara.

Si fuera posible generar matrices de proteína directamente como un derivado de una matriz de ADN por medio de un método simple, se retendría el acoplamiento entre el fenotipo y el genotipo, y sería posible realizar reacciones en el derivado de una manera espacialmente resuelta (antígeno-anticuerpos, reacciones enzimáticas) y asociarlas con la secuencia de ADN subyacente.

20 Es el objeto de la presente invención proporcionar métodos y dispositivos que permitan producir un duplicado o derivado de una matriz de moléculas con poco gasto de tiempo y coste, y un duplicado correspondiente o derivado, además de aplicaciones para un duplicado o derivado tal.

Este objeto se logra, según la invención, por un método según las reivindicaciones 1-14, un dispositivo según la reivindicación 16. Realizaciones de la invención proporcionan un método de producción de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, comprendiendo la matriz una disposición espacial de muestras de moléculas separadas, comprendiendo el método:

crear, para cada muestra, al menos un área eficaz espacialmente limitada tridimensional que está separada de las áreas eficaces de las otras muestras, una superficie, provista de un adaptador de unión o propiedades de unión, de un soporte que limita con las áreas eficaces;

30 amplificar las moléculas bioquímicas por medio de agentes de amplificación en las áreas eficaces para crear duplicados o derivados de las muestras;

unir los duplicados o derivados de las muestras al soporte por medio del adaptador de unión o las propiedades de unión, de manera que una disposición espacial de las copias o derivados de las muestras en el soporte se corresponda con la disposición espacial de las muestras en la matriz; y

35 retirar el soporte que comprende las copias de las muestras de la matriz.

Realizaciones de la invención proporcionan un duplicado o derivado de una matriz de moléculas que se produjo usando un método correspondiente.

40 Realizaciones de la invención proporcionan un dispositivo para producir un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, comprendiendo la matriz una disposición espacial de muestras de moléculas separadas, comprendiendo el dispositivo:

medios para crear, para cada muestra, al menos un área eficaz espacialmente limitada tridimensional que está separada de las áreas eficaces de las otras muestras, una superficie, provista de un adaptador de unión o propiedades de unión, de un soporte que limita con las áreas eficaces;

45 medios para amplificar las moléculas bioquímicas por medio de agentes de amplificación en las áreas eficaces para crear duplicados o derivados de las muestras, y para unir los duplicados o derivados de las muestras al soporte por medio del adaptador de unión o las propiedades de unión, de manera que una disposición espacial de los duplicados o derivados de las muestras en el soporte se corresponda con la disposición espacial de las muestras en la matriz; y

medios para retirar el soporte que comprende las copias de las muestras de la matriz.

50 Según la invención, un área eficaz espacialmente limitada tridimensional, que está separada de las áreas eficaces de las otras muestras, se pone a disposición para cada muestra de una matriz de moléculas, por ejemplo de una micromatriz de ADN, de manera que la presente invención permita producir un duplicado o derivado de una matriz correspondiente en un modo rápido, simple y económico, mientras que se retiene la información posicional que se suministra por la disposición espacial.

En particular, las realizaciones de la invención se refieren a métodos y dispositivos correspondientes en los que las moléculas son biomoléculas o moléculas químicas sintéticamente producidas. Según la invención, puede entenderse que un duplicado significa una copia 1:1 de las moléculas originales, mientras que puede entenderse que el derivado significa un cambio en las moléculas originales, por ejemplo descendientes o subconjuntos de las moléculas originales. Según la invención, puede entenderse que muestras de moléculas significan diferentes moléculas dispuestas en los diferentes sitios de una matriz, o diferentes mezclas de moléculas dispuestas allí.

Realizaciones de la invención permiten copiar micromatrices sin que se tenga ningún conocimiento de la información bioquímica, que significa también copiar micromatrices no sintéticas, en particular. Esto permite copiar, ya a partir de secuenciadores, una copia de la disposición de ADN allí presente, y así proporcionar una matriz de ADN sin tener ningún conocimiento de las secuencias.

Así, las realizaciones de la presente invención permiten producir una micromatriz correspondiente antes de, tras o durante un proceso de secuenciación, incluso sin tener ningún conocimiento de las secuencias de las muestras individuales. Así, puede ser evitada la etapa de proceso que requiere mucho tiempo y costosa de generación sintética de una matriz, y una matriz puede producirse directamente a partir de la secuenciación. Las realizaciones de la invención permiten así multiplicar una micromatriz dada o patrón de recubrimiento de una manera rápida e independientemente de si se conoce o no cualquier secuencia bioquímica o información de la micromatriz. Realizaciones de la presente invención también permiten producir diferentes variaciones del original, como puede requerirse para diferentes tareas establecidas, ya que se usan diferentes biomoléculas, por ejemplo ADN, ARN o proteínas, para diferentes cuestiones bioquímicas. Hasta la fecha, no ha sido posible producir un ADN adecuado o incluso micromatriz de proteína antes de, durante o tras un proceso de secuenciación.

Realizaciones de la invención permiten producir, por medio de un proceso de copia bioquímica, una micromatriz secundaria directamente a partir de un material primario, por ejemplo una matriz primaria de partículas, antes de, durante o tras un proceso de secuenciación, y mapear bioquímicamente dicha micromatriz secundaria con ADN, ARN o proteínas una vez más en forma de una matriz adicional, si se necesita. Además, durante las diferentes etapas de copia, variaciones de las matrices pueden producirse en una forma química, que contiene, por ejemplo, marcadores o secuencias específicos, comparables a una copia en color, donde solo podría copiarse la parte amarilla de una imagen.

Realizaciones de la presente invención se refieren a la producción de una copia de una micromatriz de una disposición de secuencias de ADN de un proceso de secuenciación (por ejemplo, matriz de partículas en un secuenciador por ABI o Roche 454), que hasta la fecha no ha sido ni descrito ni realizado. Aún cuando se han descrito sub-etapas individuales, tales como copiar bioquímicamente de ADN a ADN o de ADN a proteína, en el estado de la técnica, no se conoce, sin embargo, combinar sub-etapas individuales para producir una micromatriz a partir de un proceso de secuenciación. En particular, no se conoce hasta la fecha una línea de producción de secuenciación, seguido de producción de matrices de ADN fabricando un duplicado de una matriz de ADN del secuenciador, seguido de la producción de una matriz de ARN o matriz de proteína de la matriz de ADN.

Como ya se ilustró, no se conoce del estado de la técnica producir una matriz de ADN ya a partir de un proceso de secuenciación en curso. Por tanto, no se ha descrito hasta la fecha copiar dicha matriz de ADN directamente y entonces volver a formarla, por medio de modificaciones selectivas, en subconjuntos de micromatrices de ADN o ARN hasta micromatrices de proteína. Las realizaciones de la invención permiten, por primera vez, producir una matriz de ADN durante un proceso de secuenciación y convertirla inmediatamente en cualquier superficie de matriz deseada de manera que así se permita cualquier estudio de micromatrices común. En realizaciones de la invención, de este modo puede evitarse completamente la producción sintética de micromatrices.

Sin embargo, realizaciones de la invención no se limitan a copiar una micromatriz de un proceso de secuenciación. Más bien, las realizaciones de la invención permiten copiar directamente una micromatriz plana, tal como, por ejemplo, una micromatriz comercialmente disponible, en una manera simple y a bajo coste. Realizaciones de la invención permiten copiar selectivamente aspectos de matrices y transcribirlos para crear ARN, subconjunto de ADN, ADNc o matrices de proteína.

Métodos de copia adecuados, tales como medios de amplificación adecuados (por ejemplo, PCR, amplificación isotérmica, NASBA) y respectivamente adaptámeros de unión de correspondencia o propiedades de unión de la superficie (por ejemplo, cebadores, estreptavidina/biotina, antígeno-anticuerpos, complejos de polihistidina/níquel, propiedades electrostáticas/dinámicas o magnéticas) son obvios para un experto en la materia y no requieren que se dé explicación adicional en el presente documento. A este respecto, refiérase por favor también a los documentos mencionados en la introducción. Según realizaciones de la presente invención, al menos una copia de la información genética, por ejemplo del ADN, se produce así a partir de la información genética que puede denominarse una matriz primaria, copia que puede denominarse una matriz secundaria. Una copia de matriz adicional, que puede denominarse una matriz terciaria, puede producirse otra vez a partir de la copia. La matriz terciaria y/o secundaria pueden o bien ser una copia idéntica, una copia complementaria, un subconjunto, o bien una matriz de ARN o de proteína, dependiendo de la elección del sistema de replicación bioquímico con respecto a la matriz primaria y/o secundaria.

- En realizaciones de la invención, la matriz primaria se origina de un secuenciador de ADN. Básicamente, puede considerarse para esto cualquier secuenciador basado en partículas comercial. En realizaciones alternativas, sin embargo, puede usarse cualquier micromatriz de ADN plana como matriz primaria que va a ser copiada. Realizaciones de la invención se refieren a cualquier "proceso de copia" de una superficie cualquiera a otra, a condición de que cada muestra de la matriz tenga un área eficaz espacialmente limitada puesta a disposición para que esté separada de las otras áreas eficaces. Esto incluye cualquier biblioteca de sustancias ordenada en una manera espacialmente resuelta que contiene información bioquímica, que incluye, además de las micromatrices planas, también superficies no planas o matrices de partículas, por ejemplo, como se produce en secuenciadores o en bibliotecas de sustancias químicas.
- En realizaciones de la invención, los agentes de amplificación usados pueden ser cualquier agente de amplificación conocido. Amplificaciones previas han pretendido multiplicar segmentos de ADN específicos o secuencias. Con tales amplificaciones conocidas, la información posicional sobre dónde una hebra particular se produjo normalmente no es retenida, ya que dichas amplificaciones tienen lugar en disolución. En realizaciones de la invención, por el contrario, la información posicional de la fuente, es decir, la matriz primaria, con respecto a la copia, es decir, con respecto a la matriz secundaria, es completa o parcialmente retenida en la producción del duplicado en que cada muestra tiene un área de agente de amplificación espacialmente limitado, que está separado de las áreas de agente de amplificación de las otras muestras, puestas a disposición para ello. Esta información posicional también se denomina frecuentemente registro. Se entiende que esto significa, por ejemplo, la posición de un segmento de ADN específico como se define por su disposición (fila y columna, o posiciones x e y) dentro de una rejilla regular. Debido a esta retención al menos parcial de la información posicional, la presente invención permite la producción de duplicados de alta calidad. Cuanta más información posicional se retenga, mejor será el duplicado. Se creará una mala resolución espacial, cuando se preparan múltiples copias, copias que son de calidad cada vez peor y, por consiguiente, serán inútiles en algún punto.
- Según la invención, generalmente puede emplearse cualquier método de amplificación conocido; en algunas realizaciones, puede usarse una PCR o una amplificación en puente. La amplificación en puente puede usarse sobre una superficie. En realizaciones de la invención, el proceso de copia representa, por lo tanto, algún tipo de amplificación en puente que, sin embargo, tiene lugar de una superficie a otra, la información posicional, o el registro de las especies copiadas, que se retiene. En realizaciones alternativas, también puede usarse un sistema de unión adicional para unir las copias al soporte, por ejemplo un sistema de estreptavidina/biotina como se describe en [4], que, sin embargo, produce elevada complejidad.
- En realizaciones de la invención, los adaptadores de unión pueden disponerse sobre el área completa del soporte al que la matriz va a copiarse.
- En realizaciones de la invención, los adaptadores de unión son cebadores que son complementarios a secuencias de las moléculas que van a copiarse.
- En realizaciones de la invención, la retención de la información posicional se logra separando espacialmente o compartimentalizando las áreas de agente de amplificación asociadas a las muestras respectivas. De este modo, puede prevenirse que moléculas individuales se escapen del "microcompartimento", de manera que se retenga la resolución espacial o registro. Como ya se explicó, en realizaciones de la invención, puede considerarse cualquier técnica de amplificación como el proceso de copia, tal como PCR o amplificación isotérmica. Durante el proceso de copia, el duplicado se deposita sobre una superficie diana y se ancla. Además del hecho de que la información genética se retiene completa o parcialmente, la información posicional también se retiene. Realizaciones de la invención proporcionan un duplicado 1:1, que generalmente se entiende que significa copia "simple" de la superficie. En este proceso, se produce una copia del original que tiene el nivel más alto de similitud posible. En el caso de micromatrices, después del proceso de copia, se habrá obtenido una matriz de ADN adicional a partir de una matriz de ADN.
- Realizaciones de la invención permiten producir un duplicado parcial, es decir, un derivado, de una matriz. Se entiende que un duplicado parcial o una copia parcial significa una selección específica de la información copiada. Por ejemplo, durante el proceso de copia de una matriz de ADN, solo un tipo específico de ADN puede multiplicarse seleccionando cebadores que el soporte comprende como adaptadores de unión. De este modo, se logra un subconjunto que contiene la información deseada, tal como todas de las hebras de ADN que contienen una secuencia específica o un promotor específico.
- Asimismo, un derivado se denomina una "conversión" de la copia de un ADN a un ARN o ADNc, de un ARN a un ADN, ADNc o a una proteína. En este contexto, la información bioquímica se transforma de un tipo de molécula a otro, y todavía se retiene la información posicional.
- En realizaciones de la invención, las áreas eficaces limitadas en forma de áreas de agente de amplificación espacialmente limitadas se crean por estructuras sólidas, mientras que en realizaciones alternativas de la invención, límites de fase entre líquidos de diferentes niveles de viscosidad contribuyen a crear las áreas eficaces espacialmente limitadas.

Además, realizaciones de la invención se refieren a aplicaciones de duplicados correspondientes y derivados para fines analíticos, con respecto a sus reacciones o interacciones con otras moléculas o partículas, y con respecto a la catálisis de reacción.

5 Realizaciones de la presente invención se explicarán a continuación en más detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- Fig. 1a a 1d muestran representaciones esquemáticas en sección transversal para ilustrar una realización del método inventivo;
- Fig. 2 muestra esquemáticamente una vista desde arriba de una sección de un picoTiterPlate™;
- 10 Fig. 3 muestra esquemáticamente una representación en sección transversal de un chip secuenciador que comprende partículas de ADN;
- Fig. 4a a 4c muestra esquemáticamente representación en sección transversal para ilustrar una realización adicional del método inventivo;
- Fig. 5a a 5d muestra esquemáticamente representaciones en sección transversal para ilustrar una realización adicional del método inventivo;
- 15 Fig. 6a a 6d muestra esquemáticamente representaciones en sección transversal para ilustrar una realización adicional del método inventivo; y
- Fig. 7 muestra una representación esquemática para ilustrar una realización adicional de la invención.

20 Con referencia a las Fig. 1a a 1d, se describirá a continuación una realización de un método inventivo, en la que la matriz primaria existe en forma de un chip secuenciador 10. El chip secuenciador 10 comprende una pluralidad de microcavidades 12. Una vista desde arriba esquemática de una sección del chip secuenciador 10 que comprende las microcavidades 12 se muestra en la Fig. 2. Las microcavidades pueden tener un diámetro de 44  $\mu\text{m}$  o 29  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, como se muestra en la Fig. 2. El chip secuenciador puede ser, por ejemplo, un chip secuenciador (GS FLX 2005 y/o GS FLX Titanium 2008) del secuenciador 454 por Roche.

25 Cada una de las cavidades 12 tiene una partícula 14 dispuesta en ella, llevando cada una de dichas partículas 14 millones de copias de una hebra de ADN individual 16. Una representación en sección transversal esquemática del chip secuenciador 10 que comprende las cavidades 12 que tienen las partículas 14 que comprenden las hebras de ADN 16 introducidas en ellas se muestra en la Fig. 3. Hasta ahora, los chips secuenciadores han sido descartados después del proceso de secuenciación y han sido, por tanto, "procesos residuales" de procesos de secuenciación.

30 En la realización representada en las Fig. 1 a 3, este chip se usa como matriz primaria para producir un duplicado. El ADN va a ser copiado de las cavidades 12. Para este fin, las cavidades se llenan inicialmente con un agente de amplificación, por ejemplo una mezcla de PCR. Posteriormente, como se muestra en la Fig. 1b, se deposita un soporte 20 que sella las cavidades 12 y que lleva adaptadores de unión que coinciden con el agente de amplificación, esquemáticamente mostrado como manchas 22 en la Fig. 1b. Una vez las cavidades 12 han sido cerradas por la tapa 20, así se ha producido un área de agente de amplificación espacialmente limitada 24 para cada muestra, es decir, cada partícula 14 que tiene hebras de ADN 16 unidos a él, cuya área de agente de amplificación 24 se separa de las áreas de agente de amplificación 24 de las otras muestras. Los adaptadores de unión 22 limitan con estas áreas de agente de amplificación 24. Por ejemplo, los adaptadores de unión 22 son cebadores que coinciden con la mezcla de PCR. Dichos cebadores son sitios de unión para ADN polimerasa. La Fig. 1b muestra el estado después de la etapa de polimerasa en la que las copias bioquímicas se hacen del ADN de partícula. Estas copias se representan como líneas discontinuas 18 en la Fig. 1b. Por ejemplo, por medio de la selección de los cebadores, una mezcla de enzimas usada como agente de amplificación puede producir, en esta etapa, un ADN complementario, es decir, una copia negativa.

45 Posteriormente, las copias 18 del ADN que han sido preparadas son liberadas de las partículas 14, que puede realizarse, por ejemplo, calentando el chip secuenciador y, así, las cavidades dispuestas en él. A partir de aquí, las copias liberadas 18 se añaden a los adaptadores de unión 22, que puede promoverse, por ejemplo, enfriando el chip secuenciador. El resultado de las copias 18 que se añaden al adaptador de unión 22 y, así, al soporte 20, se representa en la Fig. 1c. En esta etapa de copia de las copias al soporte 20, la información posicional, o el registro, es retenido, ya que se proporciona un área de agente de amplificación espacialmente limitada 24 para cada muestra, y ya que las áreas de agente de amplificación 24 están separadas entre sí.

50 Posteriormente, el soporte 20 con la copias de ADN 18 unidas a él se elimina del chip secuenciador 10 y representa un duplicado de la partícula de ADN 14, 16 dispuesta dentro de las cavidades 12 del chip secuenciador 10. Las partículas 14 que comprenden las hebras de ADN 16 siguen dentro de las cavidades 12, de manera que dicha cavidad puede servir otra vez de una matriz primaria para un nuevo proceso de copia con un nuevo soporte. De este modo, básicamente puede producirse cualquier número de copias. El soporte 20 que tiene las copias de ADN 18



unidas a él puede emplearse, por ejemplo, como un biochip en un análisis de transcriptoma, en detección de la unión de proteínas sobre ADN, ARN sobre ADN, o incluso ARN sobre ARN.

5 De manera que se prepare otra vez, después del proceso de copia, la matriz primaria (el chip secuenciador 10) para un ciclo de copia adicional, el agente de amplificación dentro de las cavidades, por ejemplo la mezcla de PCR, puede sustituirse o eliminarse. Para evitar contaminaciones, una etapa de lavado, que también puede contener enzimas (como la uracil-N-glucosilasa, que digieren productos de ADN especiales), elimina los productos de PCR y permite muchas más copias sin contaminar el maestro original.

10 Las Fig. 4a a 4c representan una realización adicional de un método inventivo, en el que una micromatriz plana convencional sirve de matriz primaria. La micromatriz plana está dispuesta sobre un sustrato de matriz 30 y contiene las muestras de ADN deseadas. Las muestras de ADN tienen una disposición espacial bidimensional. Para el proceso de copia de las muestras de ADN, se proporciona una microestructura 34 que comprende cavidades 36. Se proporciona al menos una cavidad 36 para cada muestra de ADN 32. Para obtener una resolución relativamente alta, puede proporcionarse una pluralidad de, en cada caso, cavidades relativamente pequeñas 36, en realizaciones alternativas, para cada muestra de ADN 32. Las cavidades 36 tienen adaptadores de unión 38 dispuestos en ellas.

15 Las cavidades, o microcavidades, 36 se llenan con un agente de amplificación, por ejemplo una mezcla de polimerasa. La microestructura 34 se deposita entonces sobre la micromatriz 30, de manera que las cavidades 36 se bloqueen por el sustrato de matriz 30 (también funcionaría una pequeña distancia, pero potenciaría contaminaciones entre cavidades), y de forma que las muestras de ADN están dispuestas dentro de las cavidades 36 asociadas a ellas, respectivamente. De este modo, se produce, otra vez, un área de agente de amplificación espacialmente limitada 35, que está separada de las áreas de agente de amplificación 35 de las otras muestras, para cada muestra de ADN. Los adaptadores de unión 38 pueden otra vez formarse, otra vez, por un cebador que se corresponde con una mezcla de polimerasa.

20 Después de hacer que las áreas de agente de amplificación 35 se bloqueen así, tiene lugar una vez más una amplificación como la etapa de polimerasa, en la que las muestras de ADN 32 se multiplican y copian en las cavidades 36. El ADN copiado se ancla en los adaptadores de unión 38, como se muestra esquemáticamente por el ADN 42 en la Fig. 4b. Para este fin, otra vez, la temperatura de las cavidades que tienen las muestras de ADN dispuestas en ellas puede controlarse por consiguiente. Finalmente, el sustrato de ADN 30 que tiene las muestras de ADN 32 localizadas allí se elimina de la microestructura 34, de manera que la microestructura 34 con el ADN copiado 42 represente un duplicado de la micromatriz original. La microestructura 34, que se carga así con el ADN copiado 42, puede ahora usarse como molde para etapas de copia adicionales que pueden realizarse, por ejemplo, análogamente con el método como se describió anteriormente con referencia a las Fig. 1a a 1d. En este contexto, la microestructura 34 puede configurarse de forma que después del proceso de copia tenga las mismas propiedades que un chip secuenciador, por ejemplo el chip secuenciador del secuenciador 454 por Roche.

35 Una realización puede comprender una combinación de los métodos según las realizaciones anteriormente descritas. Inicialmente, un chip secuenciador puede usarse para producir, por un proceso de copia según las Fig. 1a a 1d anteriores, un soporte plano que comprende una micromatriz del ADN completo. Posteriormente, este soporte se copia una vez más según la realización descrita con referencia a las Fig. 4a a 4c. Las microcavidades así ocupadas por ADN (microcavidades 36 en las Fig. 4a a 4c) pueden ahora usarse para producir copias de ADN adicionales, por ejemplo según el método de las Fig. 1a a 1d. Alternativamente, las microcavidades ocupadas por ADN pueden usarse para producir copias modificadas en forma de ADN complementario, subgrupos de ADN, ADN acortado, extendido o modificado, o incluso ARN hasta proteínas. De este modo, puede producirse cualquier área que comprenda ADN, ARN o proteínas o péptidos.

45 Una realización adicional de un método inventivo se describirá ahora con referencia a las Figs. 5a a 5d. En esta realización, el ADN se multiplica en partículas individuales 50 por medio de una PCR de emulsión de agua en aceite. Un tipo de ADN es anclado por partícula (como en la preparación de las perlas para la secuenciación 454 o en el secuenciador ABI SOLID). Dichas partículas se colocan sobre una superficie de un soporte 52. Más específicamente, las partículas 50 se localizan en gotitas de líquido 54 respectivas, por ejemplo gotitas de agua. Las gotitas de agua se separan entre sí por una película de aceite 56. Las gotitas de agua contribuyen así a definir áreas de agente de amplificación mutuamente separadas, espacialmente limitadas 54' (Fig. 5c). Las gotitas de agua 54 pueden unirse a las posiciones respectivas sobre la superficie del soporte 52 por medio de recubrimiento hidrófilo, de manera que se dispondrán sobre el soporte 52 en una disposición espacial definida. Por ejemplo, el soporte 52 puede comprender un patrón regular de puntos hidrófilos que se corresponde con la disposición de las muestras de moléculas bioquímicas. Las gotitas de agua 54 tienen un agente de amplificación introducido en ellas en cada caso. Así, para cada muestra en forma de la partícula 50 que comprende el ADN unido a ella, se proporciona un área de agente de amplificación espacialmente limitada que está separada de las áreas de agente de amplificación de las otras muestras por los límites de fase entre los líquidos, por ejemplo agua y aceite. Como se muestra en la Fig. 5b, se proporciona un soporte 60 que comprende adaptadores de unión 62. El soporte 60 que comprende los adaptadores de unión 62 se presiona sobre la película de aceite 56, de manera que el aceite, que es de cuerpo más delgado que el agua, es desplazado, y de forma que el soporte 60 no se ponga en contacto con las gotitas de agua 54 con aquella superficie que comprende los adaptadores de unión 62. Dichas gotitas de agua 54 pueden ser fácilmente comprimidas en el proceso, como se representa en la Fig. 5c.

Posteriormente, el ADN que está unido a las partículas dentro de las gotitas 54 se amplifica por medio del agente de amplificación para crear copias de ADN. Dichas copias de ADN 64 están unidas a los adaptadores de unión 62 y se eliminan del sustrato 52 junto con el soporte 60. El soporte 60, que tiene las muestras de ADN copiadas 64 unidas a él, representa así un duplicado de la matriz original.

5 En realizaciones alternativas, los adaptadores de unión pueden proporcionarse sobre el sustrato 52 en vez de sobre el soporte 60, de manera que el ADN se copia al sustrato 52, mientras que el soporte 60 simplemente sirve de contra-soporte. Esta realización, también, por tanto, permite producir una micromatriz plana como una copia de una matriz de partículas, mientras que se usa una PCR de emulsión de agua en aceite. Así, es posible la rápida producción de una matriz de ADN. Por tanto, pueden producirse copias de ARN, copias de proteína o copias de ADN modificadas.

10 Según la invención, se produce un área eficaz espacialmente limitada para cada muestra de la matriz que va a copiarse, es decir, para la que va a crearse un duplicado o derivado. La creación espacial del área eficaz puede realizarse de diversas formas. En realizaciones de la invención, se proporciona una cavidad espacialmente cerrada para cada muestra. En realizaciones, puede proporcionarse una demarcación espacial que facilita la difusión en direcciones específicas, e impide la difusión en otras direcciones, tales como una disposición de columnas o fosos, por ejemplo. En realizaciones, puede usarse un material poroso, un material que define la difusión o estructuras moleculares que prefieren o restringen la difusión en direcciones específicas, tales como hidrogeles, aerogeles o superficies de polímero. En realizaciones, pueden usarse estructuras nano- o moleculares ordenadas o no ordenadas tales como ramas de polímeros, dendrímeros, matrices de partículas, membranas de filtro, membranas de lípido (esféricas o planas) para implementar áreas eficaces espacialmente limitadas.

15 En realizaciones, pueden usarse campos físicos tales como campos eléctricos o magnéticos que también crean una dirección de difusión preferida (electroforesis, pinzas ópticas, magnetoforesis, ondas acústicas de superficie, termoforesis,...) o una barrera de difusión y, así, formar una separación espacial, para crear áreas eficaces espacialmente limitadas. Por ejemplo, puede usarse un líquido magnético y campos magnéticos de "endurecimiento", o una rejilla de luz láser que separa las áreas individuales.

20 En realizaciones, la activación y/o desactivación puede tener lugar dentro de o fuera de las áreas eficaces con el fin de crear áreas eficaces espacialmente limitadas, por ejemplo por medio de campos eléctricos, carga, un cambio en el pH, desactivación/activación por medio de luz, presión y similares. Por ejemplo, la activación por luz de la polimerasa o la creación de nucleótidos activados por luz puede realizarse dentro de un área limitada. Entonces no tendrá lugar reacción en las áreas de oscuridad.

25 En realizaciones adicionales, pueden usarse estructuras superficiales que proporcionan un área eficaz espacialmente limitada con efectos físicos específicos. Por ejemplo, pueden mencionarse áreas hidrófobas/hidrófilas (por ejemplo, aceite y agua) o polímeros en este contexto que pueden hincharse y endurecer en áreas específicas debido a campos eléctricos, y que así pueden también definir áreas eficaces espacialmente limitadas.

30 Una realización adicional en la que un área eficaz espacialmente limitada se define por una estructura tridimensional se describirá ahora con referencia a las Fig. 6a a 6d. Como se muestra en la Fig. 6a, muestras 100 de moléculas que son parte de una matriz están dispuestas sobre elevaciones 102 de un sustrato de matriz 104. Entre las elevaciones 102, se forman depresiones 103 dentro del sustrato de matriz 104. Un soporte 106 que comprende adaptadores de unión 108 en forma de un cebador en fase sólida se coloca en la proximidad del sustrato de matriz 104, como se muestra en la Fig. 6b. Debido a la proximidad espacial del sustrato de matriz 104 y del soporte 106, surgen áreas eficaces espacialmente limitadas, en el área de las elevaciones 102, entre las superficies opuestas de las elevaciones 102 y del soporte 106. Por el contrario, el espacio entre superficies opuestas de las depresiones 102 y del soporte 106 es suficientemente grande de manera que aquí no se forme área eficaz.

35 En las áreas eficaces, el contacto entre el cebador de fase sólida y las muestras 100 permite hibridar, de manera que pueda empezar una amplificación, como se muestra en la Fig. 6c. El material para la amplificación puede ser adicionalmente suministrado de las depresiones, como se indica en la Fig. 6c por las flechas 112. De este modo, se producen duplicados 114 de las muestras 100 unidas al soporte 106, y, así, se produce un duplicado de la matriz formada por las muestras 100.

40 A partir del estado representado en la Fig. 6c, el sustrato de matriz 104 y el soporte 106 puede ahora separarse, quedando las muestras 100 en el sustrato de matriz 104, y siendo los duplicados 114 eliminados con el soporte 106. Entonces pueden prepararse copias adicionales bien a partir de la matriz localizada sobre el sustrato de matriz 104 o bien a partir del duplicado localizado sobre el soporte 106.

45 En la realización descrita con referencia a las Fig. 6a a 6d, tiene lugar esencialmente simultáneamente una amplificación y una transferencia al soporte. Si la transferencia y amplificación tienen lugar por separado entre sí, puede realizarse una etapa, en realizaciones alternativas, sobre un gran área superficial, y la otra puede realizarse de una manera espacialmente definida.

50 En la realización descrita con referencia a las Fig. 6a a 6d, las áreas eficaces espacialmente limitadas se producen así por las estructuras descritas, además de por la presencia de un cebador. En este contexto, la reacción se

corresponde con una amplificación en puente. Las superficies se ponen en contacto físico entre sí. Debido a la proximidad espacial, un "área eficaz", en la que el ADN se copia a la otra superficie, se forma en las elevaciones, es decir, los picos de las columnas. Posteriormente, dichos picos pueden incluso eliminarse, ya que la amplificación es entonces una amplificación en puente clásica que define su propia área eficaz, como si estuviera. Sin embargo, el comienzo de la reacción ocurre solo debido a la condición inicial del área eficaz espacial. Esta reacción podría denominarse una amplificación en borde o pico. El borde o pico espacial comienza la reacción. El espacio vacío a continuación del borde suministra la reacción con cualquier material requerido.

En una realización alternativa, la matriz que va a copiarse puede disponerse, difiriendo de las Fig. 6a a 6d, sobre un sustrato plano, mientras que las elevaciones se forman sobre el soporte al que se copia la matriz. Otra vez, alternativamente, pueden formarse elevaciones tanto sobre el sustrato de matriz como sobre el soporte.

Una realización con referencia a cómo áreas eficaces espacialmente limitadas pueden producirse por campos de energía, por ejemplo campos magnéticos o eléctricos, se representa en la Fig. 7. La Fig. 7 muestra simplemente, esquemáticamente, un sustrato de matriz 120 y un soporte 122. Muestras de moléculas sobre el sustrato de matriz 120 que van a copiarse, además de adaptadores de unión sobre el soporte 122, no se representan por simplicidad. En el área de muestras respectivas de moléculas, están dispuestos medios de generación de campo 124 que están configurados para generar campos de energía 126 en un agente de amplificación dispuesto entre el sustrato de matriz 120 y el soporte 122. De este modo, se crean áreas eficaces espacialmente limitadas 128 en las que el agente de amplificación se activa, mientras que esto no es el caso en las áreas restantes.

Realizaciones de métodos inventivos han sido ilustradas anteriormente. Realizaciones de dispositivos correspondientes o medios para implementar las etapas de método inventivo resultan de la descripción o son obvias para un experto en la materia. Por tanto, no hay necesidad de ilustrar adicionalmente que un dispositivo inventivo pueda comprender medios de manipulación adecuados para situar las entidades físicas, por ejemplo las diversas matrices, soportes o sustratos, según se requiera.

Además, no es necesario explicar adicionalmente que medios flúidicos adecuados pueden proporcionarse de manera que suministren los líquidos o agentes respectivos en las posiciones necesarias. Además, es obvio para un experto en la materia que puede proporcionarse un controlador correspondiente para controlar el dispositivo para realizar los métodos inventivos. También pueden proporcionarse medios de creación de un entorno requerido para realizar los métodos, por ejemplo sensores de temperatura.

Realizaciones de la invención son adecuadas, en particular, para crear un duplicado o derivado de matrices en el que las moléculas son oligonucleótidos mono- o bicatenarios, polinucleótidos, moléculas de ADN o sintéticas análogas a ADN (PNA). En realizaciones de la invención, una disposición espacialmente plana, tal como una micromatriz, una disposición espacial de partículas, por ejemplo dentro de un chip secuenciador, una disposición espacial de cavidades, por ejemplo dentro de un picoTiterPlate™, o una disposición espacial de diferentes fases, por ejemplo de gotitas de líquido individuales, puede servir de matriz primaria. Además, ensayos basados en partículas, tales como por las empresas de Illumina o Applied Biosystems (SOLID), por ejemplo, también pueden ser consideradas como tales tipos de matrices. En realizaciones, las moléculas bioquímicas, por ejemplo los oligo- o polinucleótidos, pueden copiarse de un proceso de secuenciación para derivar el genoma, de un proceso de secuenciación para derivar el transcriptoma, de un proceso de secuenciación de ARN (tal como ARNm, ARNt, ARNip o ARN en general), o de un proceso de mutaciones de secuenciación y variaciones. Las copias producidas pueden ser, en realizaciones de la invención, ADN, ADN modificado (extendido, acortado, artificial, inserciones, delección, mutación ...), construcciones de ADN (vectores de expresión, ARNip), moléculas artificiales (PNA, péptidos modificados), expresiones, ARN o proteínas, en cada caso para producir una matriz.

En realizaciones de la invención, pueden copiarse oligo- o polinucleótidos de un proceso de secuenciación para generar una matriz o una superficie estructurada. En realizaciones, pueden copiarse oligo- o polinucleótidos de una disposición de partículas para producir una matriz o para el recubrimiento de una superficie. En realizaciones de la invención, pueden copiarse oligo- o polinucleótidos de una superficie para crear una copia, para crear una copia complementaria, o para modificar fisicoquímicamente la superficie.

En realizaciones de la presente invención, pueden copiarse oligo- o polinucleótidos a una superficie adicional con el fin de modificación química o bioquímica para una aplicación basándose en las nuevas propiedades superficiales, o para cadenas de proceso bioquímico para producir sustancias químicas. En realizaciones de la invención, puede copiarse una matriz de partículas que puede, pero no necesita, producirse, por ejemplo, por medio de una PCR de emulsión de agua en aceite, sin tener que secuenciarse, para producir una matriz de una biblioteca de ADN, para producir una matriz que comprende diversos mutantes de ADN, para la copia adicional de dichas matrices a ARN o proteínas, o para usar las copias en experimentos celulares.

Realizaciones de la invención pueden emplearse en numerosos campos de aplicación. Ejemplos de tales campos de aplicación son secuenciación, análisis de transcritos, medición de actividad de ADN, ARN o proteína, estudios de expresión, técnicas de presentación, mientras que se emplea presentación en fago, presentaciones en ribosomas o presentaciones en células, y estudios de metabolito. Además, la invención puede aplicarse en estudios de interacción, por ejemplo, los siguientes: ADN/ADN; ADN/ARN; ADN/proteína; ARN/proteína; ARN/célula;

proteína/proteína; actividad de cinasa; actividad de proteasa; actividad de fosfatasa; proteínas de unión a ADN; mapeo de epítopes; determinación de patógenos; y determinación de sustancias o inhibidores. La invención puede permitir este análisis, que es parcialmente imposible hoy en día con un gran número de componentes de interacción en el lado de la matriz.

- 5 Además, la presente invención puede aplicarse en el campo del desarrollo de vacunas, siendo un ejemplo como sigue. Supongamos que aparece un nuevo virus/bacteria. Se toma una muestra de células o una muestra de sangre del primer ser vivo que sobrevive. La muestra de células se infecta con el virus, y se aísla el ARNm. Entonces se secuencia dicho ARNm, y el ADN obtenido se copia a partir de él. Posteriormente, la matriz de ADN se transcribe en una matriz de proteína. De este modo, esta matriz contendrá proteínas de la célula y proteínas que se modifican debido al ataque del virus. La muestra de sangre se pone sobre la matriz, y los anticuerpos contenidos en ella se unen a las proteínas. Solo se unirán anticuerpos a las proteínas virales, ya que los anticuerpos por sí mismos no se unen a proteínas del mismo cuerpo. Los anticuerpos unidos pueden entonces identificarse por medio de una etapa de secado. Así, pueden determinarse las secuencias de ADN y de proteínas del virus. De este modo, se obtiene conocimiento, dentro de un periodo muy corto, sobre epítopes y proteínas de unión de los anticuerpos. Con esta información, por tanto, pueden producirse inmediatamente tanto las vacunas pasivas como las activas. De este modo, en el caso de una epidemia, el tiempo necesario antes de que una vacuna pueda producirse puede reducirse espectacularmente.

- Realizaciones de la presente invención permiten, por tanto, un ciclo de trabajo completo en el que la matriz de secuencias de ADN (matriz primaria) que se produce durante un proceso de secuenciación va a transferirse a una superficie, y en el que, así, una copia de este ADN (matriz secundaria) va a producirse. Además, en realizaciones, la matriz primaria o secundaria va a modelarse adicionalmente como copia adicional en forma de ARN o proteína (matriz terciaria). En realizaciones, cada matriz de moléculas bioquímicas, tales como ADN, puede considerarse una matriz primaria. Por tanto, seleccionando adecuadamente la técnica de copia, puede producirse una copia idéntica o selectiva del original. Por tanto, realizaciones de la invención se refieren a mapear - incluso antes de, durante o después de la secuenciación génica - la matriz usada en el proceso, y a volver a formarla opcionalmente en un gen, ADNc, ARN o incluso matriz de proteína en etapas de copia adicionales.

- Son ventajosas realizaciones de la invención en las que la información molecular puede ser duplicada, de una manera espacialmente resuelta, cualquier número de veces incluso durante un proceso de secuenciación. Solo se requiere un original como maestro para este fin. No se necesita que exista información sobre la naturaleza del original y los datos contenidos en él. El proceso de copia es, por tanto, independiente de la información incluida. Además, las realizaciones de la invención permiten producir micromatrices o la copia de estructuras superficiales bioquímicas sin emplear síntesis *in situ* o unidades de impresión/dispensación. El proceso de copia tiene lugar a un nivel molecular y usa sistemas bioquímicos bien establecidos. Como se retiene la información posicional, el proceso de copia permite procesamiento altamente paralelo de la información bioquímica. Esto permite conectar diferentes tipos de micromatrices a un nivel molecular y evita la producción que requiere tiempo y costosa de micromatrices después de tener conocimiento de una secuencia.

- En realizaciones de la invención, micro- o nanoestructuras que contribuyen a definir áreas de agente de amplificación espacialmente limitadas comprenden una matriz no ordenada basada, en particular, en una membrana de filtro, en un hidrogel o en un aerogel. En realizaciones de la invención, las micro- o nanoestructuras se basan en un sustrato tridimensional ordenado.

En realizaciones de la invención, las áreas de agente de amplificación espacialmente limitadas están separadas, al menos en parte, por límites de fase entre dos fluidos, un fluido y un gas, o un límite físico, en particular una membrana de lípido.

- En realizaciones de la invención, el proceso de unión de los duplicados o derivados al soporte también puede realizarse simultáneamente con la amplificación, o ser parte de la amplificación, en el que un adaptador de unión inmovilizado actúa de un cebador para la amplificación. Además, pueden unirse derivados al soporte mediante una molécula de captura inmovilizada, o en aquél que quedan acoplados al sistema usado para producirlos, y en el que dicho sistema está inmovilizado sobre el soporte. Este sistema puede consistir, por ejemplo, en enzimas, ribosomas o células.

- En realizaciones de la invención, la limitación espacial del área eficaz consiste en que los adaptadores de unión están presentes en el soporte, como cebadores complementarios, en forma de una matriz de cebador que puede comprender una distribución regular o irregular de manchas, siendo el tamaño de manchas y la densidad de manchas sobre el soporte iguales o más pequeños que aquellos sobre la matriz.

- En realizaciones de la invención, el agente de amplificación está configurado para efectuar una amplificación de ADN, en particular una reacción en cadena de la polimerasa, una amplificación isotérmica, por ejemplo, una amplificación de NASBA, y el adaptador de unión comprende un cebador de correspondencia.

En realizaciones de la invención, se generan derivados primarios, secundarios y/o terciarios, de una matriz primaria o un duplicado de la matriz primaria, en la que el ADN se transcribe en ARN, el ARN se traduce en proteína, o en la

que un aglutinante se enriquece mientras que se usa una proteína producida, un ARN producido o un ADN producido o la copia del mismo de una fase líquida, o en la que un aglutinante interacciona.

5 En realizaciones de la invención, se genera un derivado sobre la fase sólida de una matriz diana, y está presente aquí en una manera inmovilizada. En realizaciones de la invención, las posiciones de las muestras tienen moléculas adicionales o secuencias de ADN o células localizadas allí que son parte de la muestra o se inmovilizan y que se requieren para generar derivados, en particular secuencias de vector de expresión tales como ori, promotores, sitios de unión a ribosoma, codón de iniciación, sitios de escisión de endoproteasa, secuencias de fusión, genes indicadores, terminadores, genes de resistencia a antibióticos, sistemas de traducción *in vitro*, o células.

10 Realizaciones de la invención se refieren a un duplicado o derivado de una matriz de moléculas que se produjo mientras que se empleaba un método inventivo, y a aplicaciones de un duplicado o derivado tal. En realizaciones de la invención, un duplicado o derivado tal se usa para asociar una reacción entre un aglutinante, en particular una proteína, anticuerpo o antígeno, y una molécula original, su replicado o su derivado, con la secuencia de ADN de la molécula original, en particular para el acoplamiento genotipo-fenotipo. En realizaciones de la invención, un duplicado o derivado tal se usa para asociar una reacción en la que la molécula original, su copia o su derivado cataliza la conversión de un sustrato, con la secuencia de ADN de la molécula original, en particular para acoplamiento genotipo-fenotipo. Realizaciones de la invención se refieren a una secuencia de ADN identificada por una utilización tal, y a productos o preparaciones producidos basándose en una secuencia de ADN tal, en particular anticuerpos, antígenos, vacunas o antibióticos.

20 En realizaciones de la invención, un duplicado o derivado que se produjo según un método inventivo se usa para detectar reacciones entre una muestra, un duplicado o derivado del mismo con una molécula o partícula de interacción, siendo dicha detección realizada por un sensor óptico, electroquímico o magnético, y llevando la molécula o partícula de interacción un marcador correspondiente, o siendo dicha detección realizada, sin ningún marcador, mediante el cambio en el campo evanescente o una frecuencia de resonancia modificada, o empleando pinzas ópticas, o acoplando la reacción con un cambio en la absorción, en particular precipitación o cambio de color, o con la emisión de luz, en particular quimioluminiscencia. En realizaciones de la invención, también se usa un dispositivo de secuenciación idéntico que se usa para detectar la secuenciación para detectar las reacciones.

25 Realizaciones de la invención se refieren a la utilización de un duplicado o derivado correspondiente para realizar reacciones en el duplicado o derivado de la matriz, una cámara o estructura fluidica que comprende conectar terminales que se aplican sobre la superficie del duplicado o derivado, o el duplicado o derivado que se introduce en una cámara correspondiente, siendo posible incubar la cámara a una temperatura específica, y sustituir líquidos contenidos dentro de la cámara. Tal utilización también puede tener lugar en un dispositivo que también se usa para la secuenciación de la matriz.

30 Realizaciones de la invención se refieren a la utilización de un duplicado correspondiente o derivado para realizar simultáneamente reacciones y detecciones en el duplicado o derivado. Realizaciones de la invención se refieren a un método de secuenciación de una matriz de líquido-partícula, siendo un duplicado creado a partir de muestras contenidas en partículas, y siendo el duplicado secuenciado en un dispositivo de secuenciación.

35 Realizaciones de la invención, el progreso de la reacción puede leerse, durante el proceso de amplificación o de unión, usando métodos convencionales. Esto permite aplicaciones en los campos de enzima, unión y reacción cinética. Por ejemplo, puede producirse una enzima que se une a CO<sub>2</sub>. Dicha enzima podría entonces identificarse inmediatamente por un cambio en el valor de pH. Similarmente, podrían identificarse otras actividades enzimáticas o catalíticas o propiedades de unión. Éstas incluyen, por así decirlo, cualquier técnica de medición bioquímica que mide la mera presencia de una molécula hasta su modo de acción. Realizaciones de la invención, por tanto, comprenden monitorizar cualquier cambio en parámetros físicos o químicos usando métodos de detección muy conocidos dentro de las áreas eficaces individuales durante la aplicación, que permite un nivel de percepción en los mecanismos de operación de tanto el agente de amplificación como la matriz primaria, además de sus derivados que no existieron hasta ahora.

40 Realizaciones de la invención proporcionan la utilización de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas que se produjo mientras que se usaba un método según la invención para identificar una secuencia de ADN, una secuencia de ARN, una proteína o una función catalítica, de señalización (por ejemplo, de potenciamiento, alostérica, inhibidora...) o enzimática (por ejemplo, lítica, actividad de fosfatasa, actividad de cinasa...) de un ADN, ARN o proteína.

45 Realizaciones de la invención proporcionan la utilización de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas que se produjo mientras que se usaba un método según la invención para identificar una secuencia de ADN, una secuencia de ARN o secuencia peptídica, y para la producción, identificación o preparación de un producto, en particular anticuerpo, antígeno, vacuna o antibiótico, basándose en la secuencia de ADN, ARN o peptídica.

## Bibliografía

[1] Yu A.A. et al, "Contact Printing Beyond Surface Roughness: Liquid Supramolecular Nanostamping", Adv. Mater. 2007, 19, páginas 4338 a 4342;

- [2] Blanchard A.P., Friend. S.H., Nature Biotech (1999) 17, página 953 y siguientes.
- [3] Sitio web: <http://www.techno-preneur.net/technology/New-technologies/life-sciences/novel.htm>
- [4] WO 2008/022332 A2
- 5 [5] Kim J., Crooks R., JACS, 128, páginas 12076 a 12077 (2006) describe la copia de una matriz de ADN usando un sistema de estreptavidina/biotina
- [6] Kim J., Crooks R., Anal Chem (2007) 1, 79: páginas 8994 - 8999;
- [7] He M. et.al, Nat Methodes (2008), 5: páginas 175 - 177;
- [8] Ramachandran N, et.al; Methodes Mol Biol (2006); 328: páginas 1 a 14;
- [9] US 6017738
- 10 [10] US 6274351 B1
- [11] Patente de EE.UU. 6.300.070 B1;
- [12] Abrams E.S. et al, Diagnostic and Gene Detection Ch.1.9, páginas 171-189 (1997);
- [13] Laborwelt, edición 3, vol. 8 (2007);
- 15 [14] Shendure J. et al., "Next-generation DNA sequencing", Nature Biotechnology, vol. 26, No. 10, Octubre de 2008, páginas 1135 a 1145;
- [15] Handbuch Illumina für den Genome Analyser [Manual de Illumina para el analizador del genoma] (2007);
- [16] Kane R.S. et.al, Biomaterials (1999) 20, páginas 2363 a 2376;
- 20 [17] Torres T.T. et. al., Genome Research, <http://genome.cshlp.org/cgi/content/abstract/gr.6984908v1#otherarticles>;
- [18] EP 1203945 B1

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, comprendiendo la matriz una disposición espacial de muestras de moléculas separadas, comprendiendo el método:
- 5            crear, para cada muestra, al menos un área eficaz espacialmente limitada tridimensional, en el que dicha área eficaz espacialmente limitada está separada de las áreas eficaces de las otras muestras,
- en el que una superficie de un soporte limita con las áreas eficaces;
- en el que dicha superficie está provista de un adaptador de unión o propiedades de unión,
- en el que la producción de un área eficaz espacialmente limitada comprende producir un área de agente de amplificación espacialmente limitada; amplificar las moléculas por medio de agentes de amplificación en las
- 10            áreas eficaces para crear duplicados o derivados de las muestras;
- unir los duplicados o derivados de las muestras al soporte por medio del adaptador de unión o las propiedades de unión, de manera que una disposición espacial de las copias o derivados de las muestras sobre el soporte se corresponda con la disposición espacial de las muestras en la matriz; y
- retirar el soporte que comprende los duplicados o derivados de las muestras de la matriz.
- 15            2. El método según la reivindicación 1, en el que las áreas de agente de amplificación espacialmente limitadas se definen, al menos en parte, por micro- o nanoestructuras dentro de un sustrato de matriz de la matriz o dentro del soporte.
3. El método según la reivindicación 2,
- 20            - en el que las micro- o nanoestructuras comprenden una matriz no ordenada basada en una membrana de filtro, en un hidrogel o en un aerogel, o
- en el que las micro- o nanoestructuras se basan en un sustrato tridimensional ordenado.
4. El método según la reivindicación 1,
- 25            - en el que la producción de al menos un área de agente de amplificación espacialmente limitada para cada muestra comprende proporcionar las muestras en entrantes por separado mutuamente asociados dentro del sustrato de matriz, introducir el agente de amplificación en los entrantes y bloquear los entrantes por el soporte, o
- en el que las áreas de agente de amplificación espacialmente limitada están separadas, al menos en parte, por límites de fase entre dos líquidos, un líquido y un gas, o un límite físico, en particular una membrana de lípido, o
- 30            - en el que las áreas de agente de amplificación espacialmente limitada están separadas, al menos en parte, por límites de fase entre dos líquidos, un líquido y un gas, o un límite físico, en particular una membrana de lípido, y en el que la producción de al menos un área de agente de amplificación espacialmente limitada para cada muestra comprende proporcionar las muestras en gotitas de líquido mutuamente separadas que contienen el agente de amplificación y que se fijan, en la disposición espacial, sobre un sustrato de matriz de la
- 35            matriz, estando un líquido de cuerpo más delgado dispuesto entre las gotitas de líquido, y disponiendo el soporte en relación con el sustrato de matriz de forma que la superficie, provista del adaptador de unión del soporte, limite con las gotitas de líquido.
- 40            5. El método según la reivindicación 2 o 3, en el que la producción de al menos un área de agente de amplificación espacialmente limitada comprende proporcionar el soporte (34) que tiene al menos un entrante que está asociado con cada muestra y tiene el adaptador de unión dispuesto en ella, introducir el agente de amplificación en los entrantes y bloquear los entrantes por medio del sustrato de matriz de manera que las muestras se expongan al área de agente de amplificación.
- 45            6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la producción de un área de agente de amplificación espacialmente limitada para cada muestra comprende proporcionar la muestra dentro de un chip secuenciador o una placa de nanopocillos.
7. El método según la reivindicación 1,
- en el que el proceso de unión de los duplicados o derivados al soporte se realiza simultáneamente con la amplificación, o
- 50            - en el que la limitación espacial del área eficaz consiste en que los adaptadores de unión están presentes sobre el soporte, como cebadores complementarios, en forma de una matriz de cebadores que puede

comprender una distribución regular o irregular de manchas, siendo el tamaño de la mancha y la densidad de manchas sobre el soporte iguales a o más pequeños que aquellos sobre la matriz.

8. El método según la reivindicación 1, en el que la limitación espacial de las áreas eficaces se efectúa aplicando un campo de energía.
- 5 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las muestras se proporcionan en forma de moléculas unidas a partículas.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
- en el que la matriz de moléculas es una matriz no sintética de biomoléculas, o
  - en el que las moléculas son oligonucleótidos mono- o bicatenarios, polinucleótidos, ADN o moléculas sintéticas análogas a ADN (PNA), o
  - en el que la matriz consiste en un proceso de secuenciación para derivar el genoma, un proceso de secuenciación para derivar el transcriptoma, un proceso de secuenciación de ARN, ARNm, ARNt, ARNip, o un proceso de secuenciación de mutaciones y variaciones, o
  - en el que por medio de amplificación y unión al soporte, se crean copias que se corresponden con un ADN, un ADN modificado, expresiones de un ADN, un ARN, proteínas o péptidos; o
  - en el que el agente de amplificación efectúa una amplificación de ADN, en particular una reacción en cadena de la polimerasa, una amplificación isotérmica, o una reacción de NASBA, y el adaptador de unión comprende un cebador de correspondencia, o
  - en el que el método comprende además monitorizar cualquier cambio en parámetros físicos o químicos dentro de las áreas eficaces
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las posiciones de las muestras tienen moléculas adicionales o secuencias de ADN o células aquí localizadas que son parte de la muestra o se inmovilizan y que se requieren para generar derivados, en particular secuencias de vector de expresión tales como ori, promotores, sitios de unión a ribosoma, codón de iniciación, sitios de escisión de endoproteasa, secuencias de fusión, indicadores de genes, terminadores, genes de resistencia a antibióticos, sistemas de traducción *in vitro*, o células.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,
- en el que los derivados primarios, secundarios y/o terciarios se generan a partir de una matriz primaria o un duplicado de la matriz primaria, en el que el ADN se transcribe en ARN, el ARN se traduce en proteína, o en el que un aglutinante se enriquece mientras que se usa una proteína producida, un ARN producido o un ADN producido o la copia del mismo a partir de una fase líquida, o en el que un aglutinante interacciona, o
  - en el que un derivado se genera sobre la fase sólida de una matriz diana y está presente allí de una manera inmovilizada.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende además:
- asociar una reacción entre un aglutinante, en particular una proteína, anticuerpo o antígeno, y una molécula original, su duplicado o su derivado, con la secuencia de ADN de la molécula original, en particular para el acoplamiento genotipo-fenotipo, o
  - asociar una reacción en la que la molécula original, su copia o su derivado cataliza la conversión de un sustrato, con la secuencia de ADN de la molécula original, en particular para el acoplamiento genotipo-fenotipo, o
  - identificar una secuencia de ADN, una secuencia de ARN, una proteína o una actividad catalítica, de señalización, en particular de potenciamiento, alostérica, inhibidora o enzimática, en particular lítica, de fosfatasa, cinasa, función de un ADN, ARN o proteína, o
  - identificar una secuencia de ADN, una secuencia de ARN o una secuencia peptídica y para la producción, identificación o preparación de un producto, en particular anticuerpo, antígeno, vacuna o antibiótico, basándose en la secuencia de ADN, ARN o peptídica, o
  - detectar reacciones entre una muestra, un duplicado o derivado del mismo con una molécula de interacción o partícula, siendo dicha detección realizada por un sensor óptico, electroquímico o magnético, y llevando la molécula de interacción o partícula un marcador correspondiente, o siendo dicha detección realizada, sin ningún marcador, mediante el cambio en el campo evanescente o una frecuencia de resonancia modificada, o



empleando pinzas ópticas, o acoplado la reacción con un cambio en la absorción, en particular precipitación o cambio de color, o con la emisión de luz, en particular quimioluminiscencia, o

5 - realizar reacciones en el duplicado o derivado de la matriz, una cámara o estructura fluídica que comprende conectar terminales que se aplican sobre la superficie del duplicado o derivado, o siendo el duplicado o derivado introducido en una cámara correspondiente, siendo posible incubar la cámara a una temperatura específica, y sustituir líquidos contenido dentro de la cámara, o

- realizar simultáneamente reacciones y detecciones en el duplicado o derivado.

10 14. El método según la reivindicación 13, en el que un dispositivo de secuenciación idéntico que se usa para detectar la secuenciación también se usa para detectar las reacciones o en el que la utilización está dentro de un dispositivo que también se emplea para la secuenciación de la matriz.

15. Un método de secuenciación de una matriz de líquido-partícula, siendo un duplicado creado a partir de las muestras contenidas en las partículas según la reivindicación 9, y siendo el duplicado secuenciado en un dispositivo de secuenciación.

15 16. Un dispositivo para producir un duplicado o derivado de una matriz de moléculas, comprendiendo la matriz una disposición espacial de muestras de moléculas separadas comprendiendo el dispositivo:

medios para crear, para cada muestra, al menos un área eficaz espacialmente limitada tridimensional

que está separada de las áreas eficaces de las otras muestras,

20 una superficie, provista de un adaptador de unión o propiedades de unión de un soporte que limita con las áreas eficaces; medios para amplificar las moléculas por medio de agentes de amplificación en las áreas eficaces para crear duplicados o derivados de las muestras, y para unir los duplicados o derivados de las muestras al soporte por medio del adaptador de unión o las propiedades de unión, de manera que una disposición espacial de las copias o derivados de las muestras sobre el soporte se corresponda con la disposición espacial de las muestras; y

medios para retirar el soporte que comprende las copias de las muestras de la matriz.

25

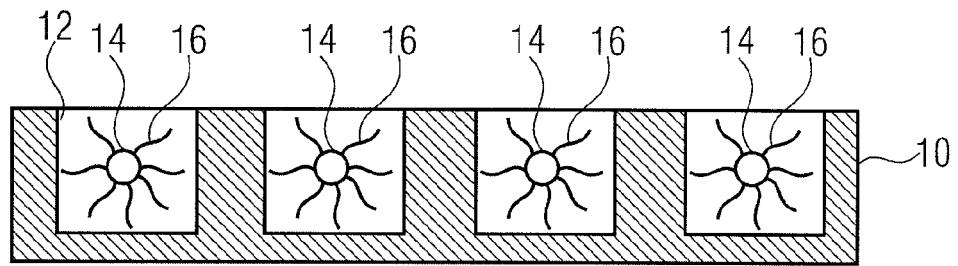


FIGURA 1A

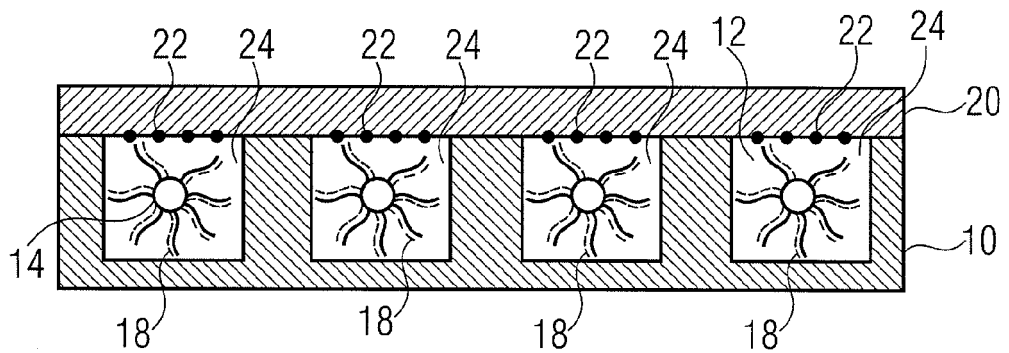


FIGURA 1B

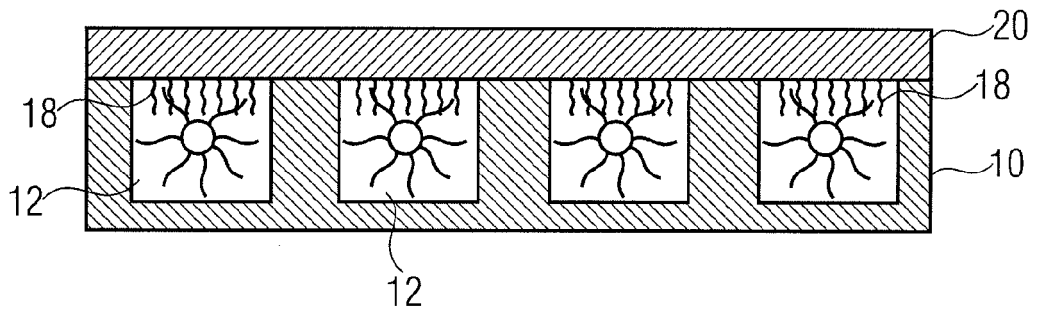


FIGURA 1C

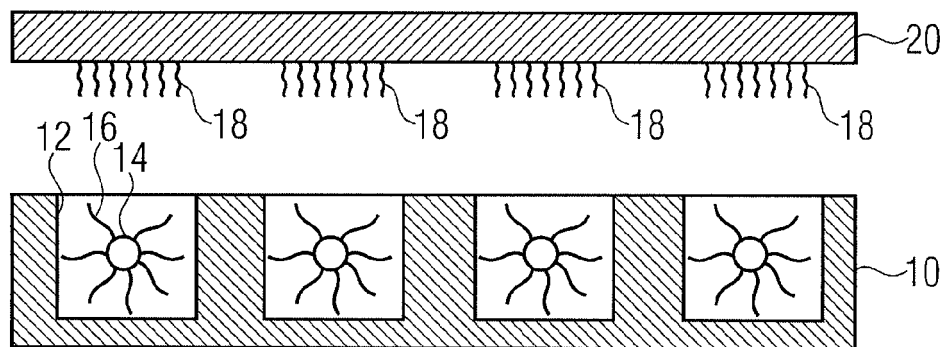


FIGURA 1D

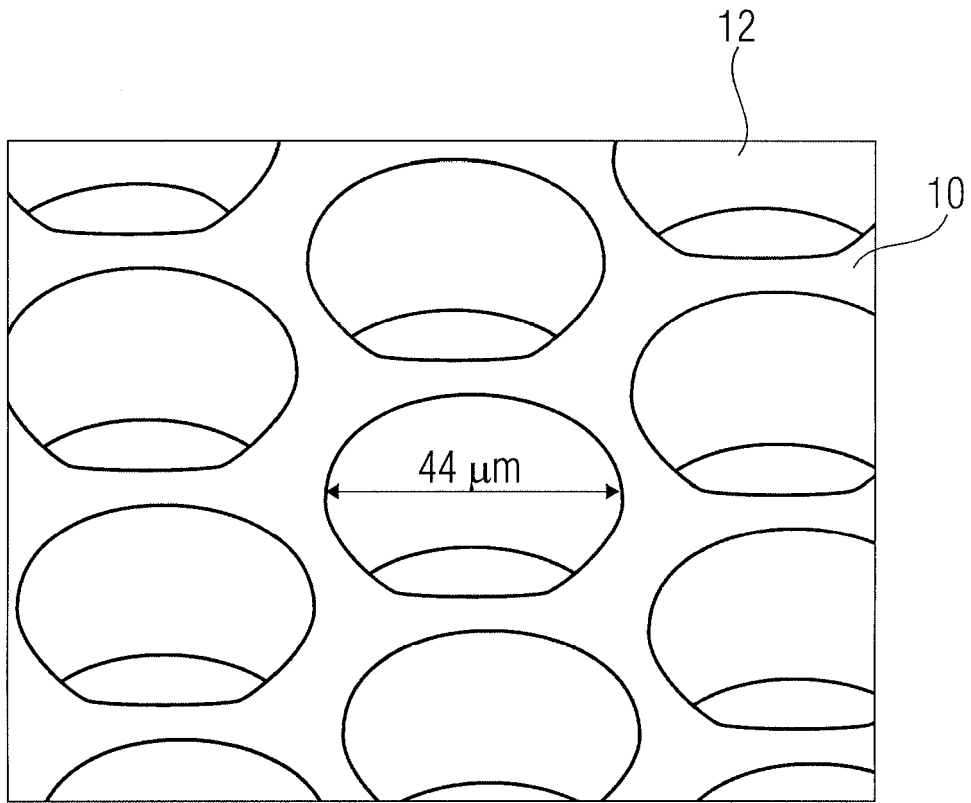


FIGURA 2

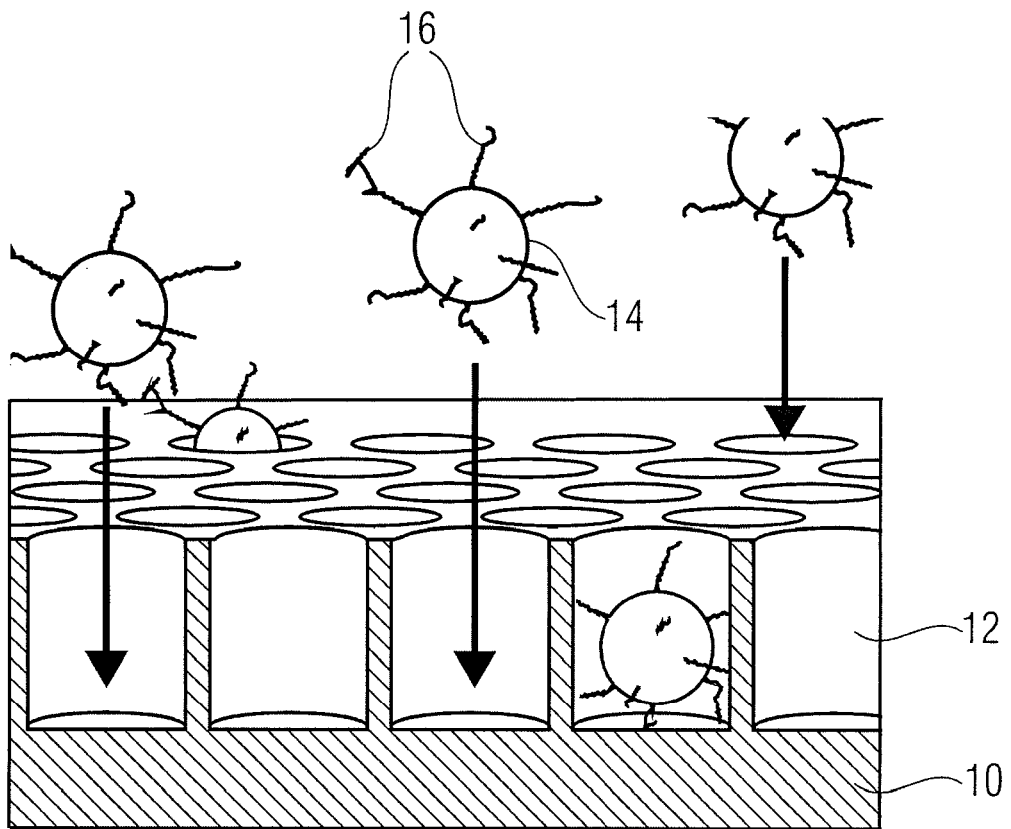


FIGURA 3

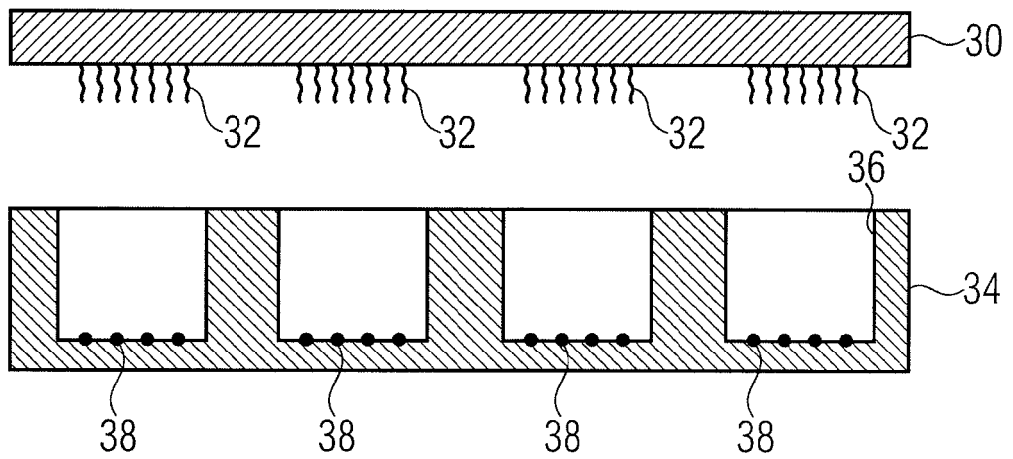


FIGURA 4A

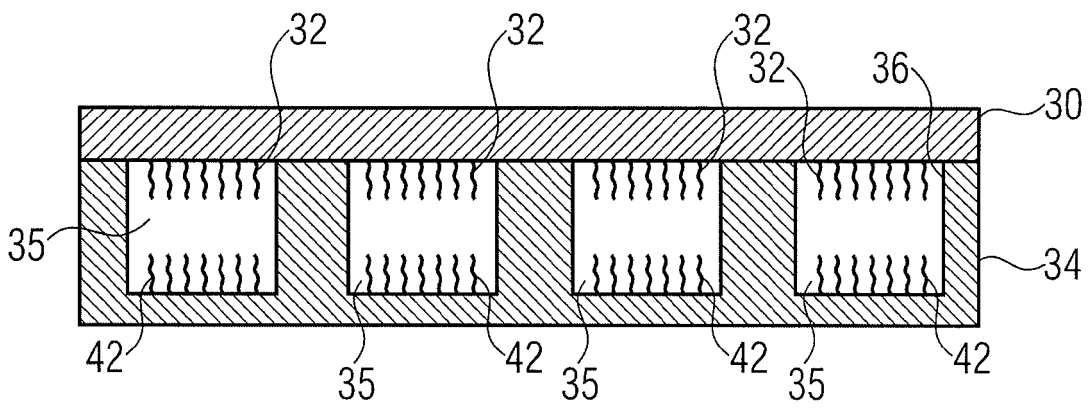


FIGURA 4B

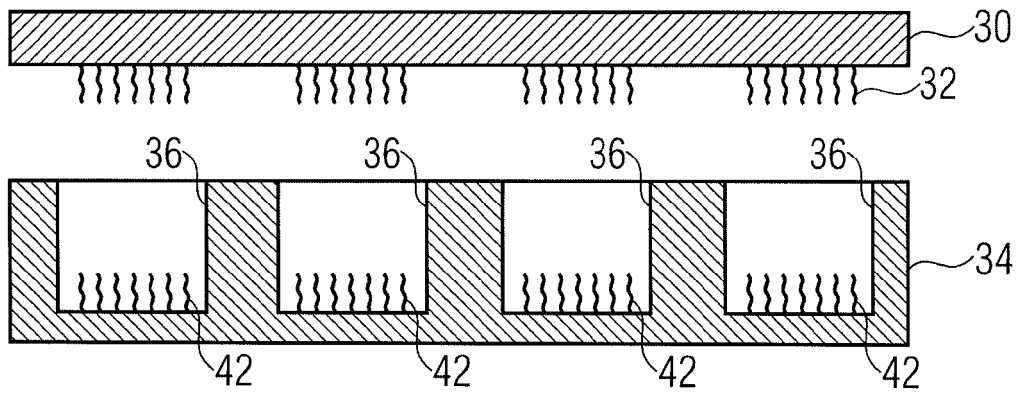


FIGURA 4C

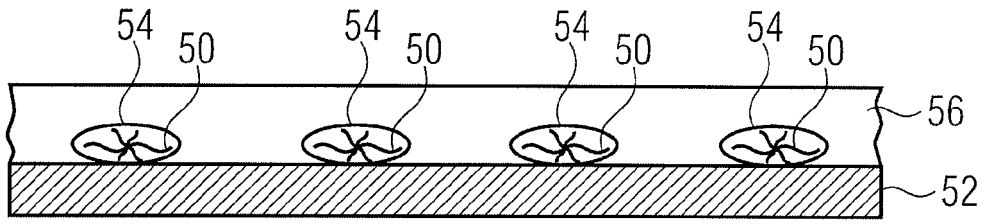


FIGURA 5A

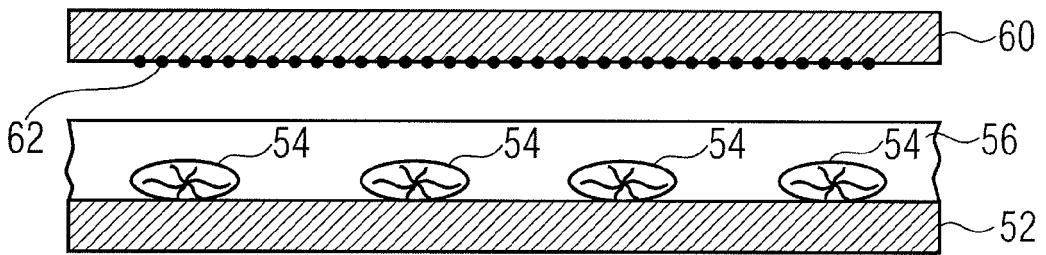


FIGURA 5B

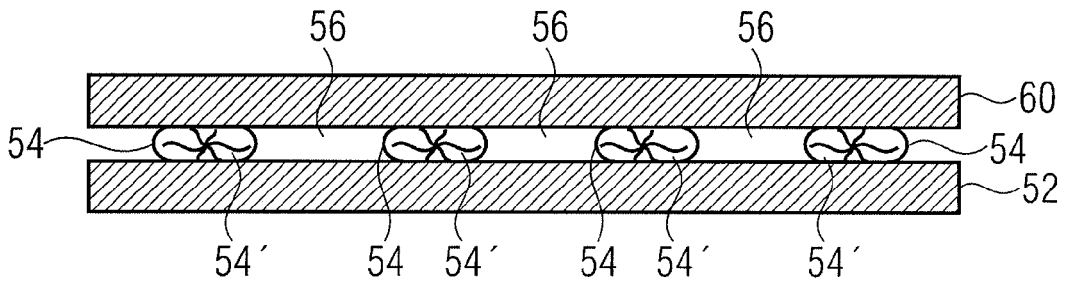


FIGURA 5C

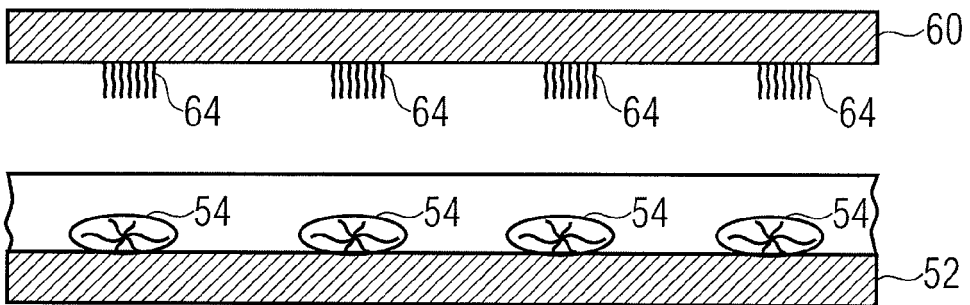


FIGURA 5D

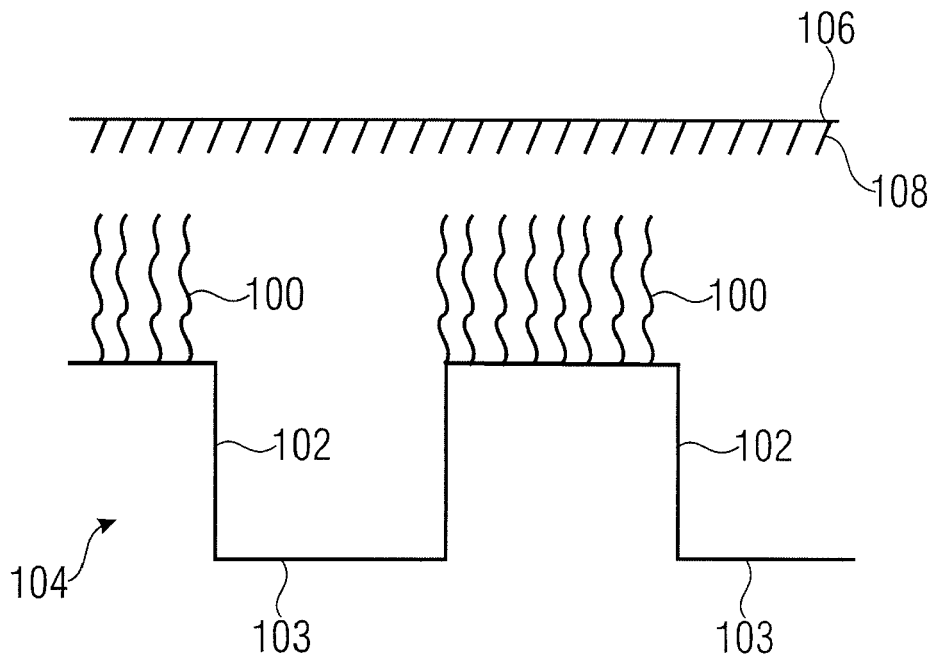


FIGURA 6A

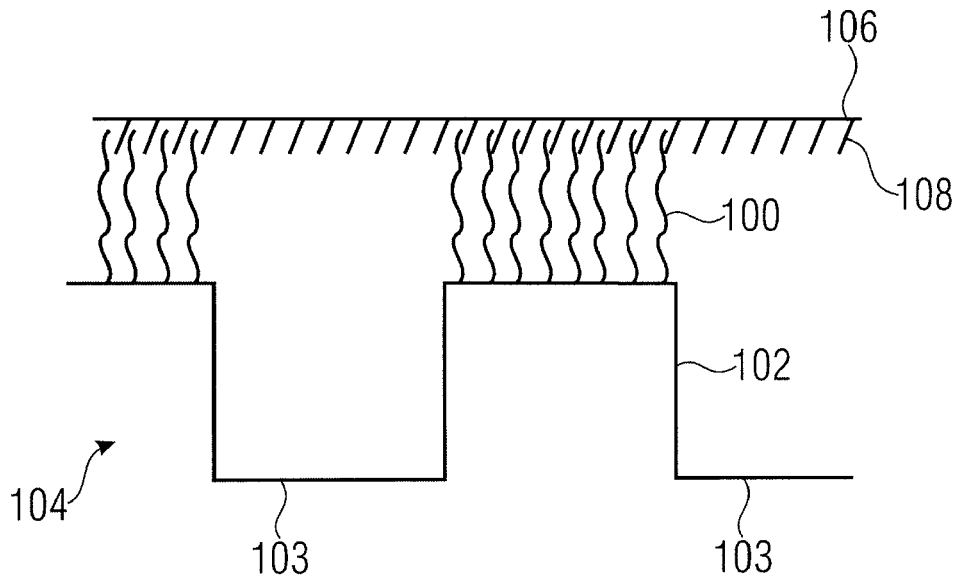


FIGURA 6B

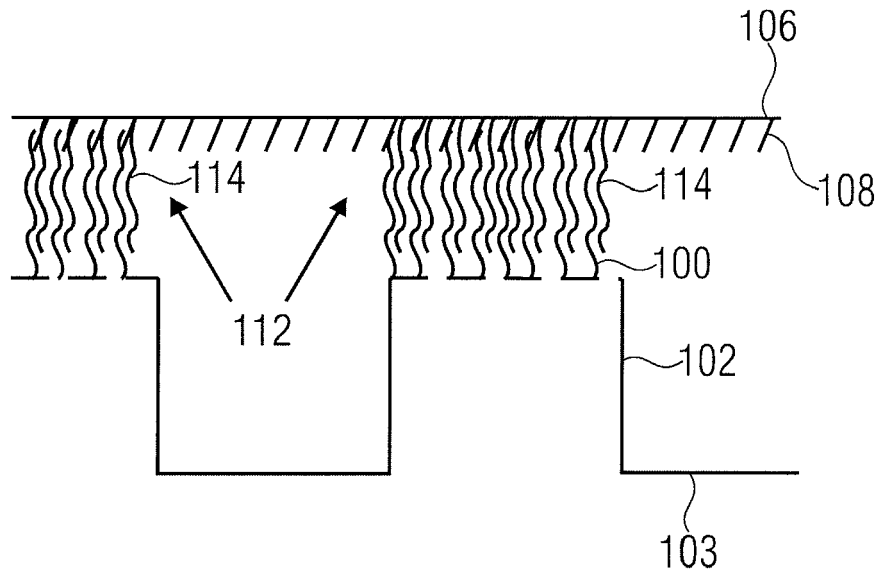


FIGURA 6C

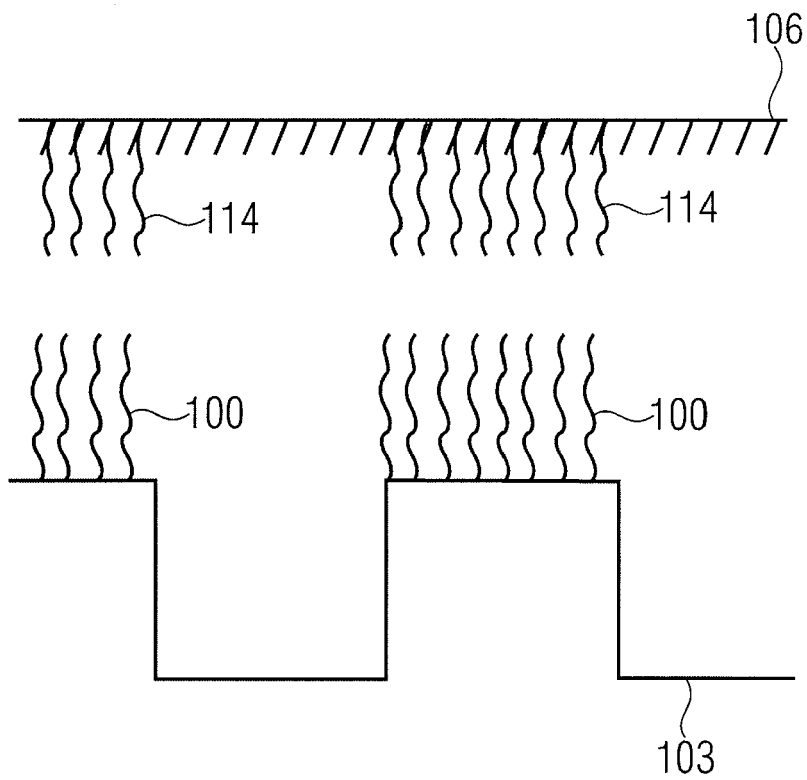


FIGURA 6D



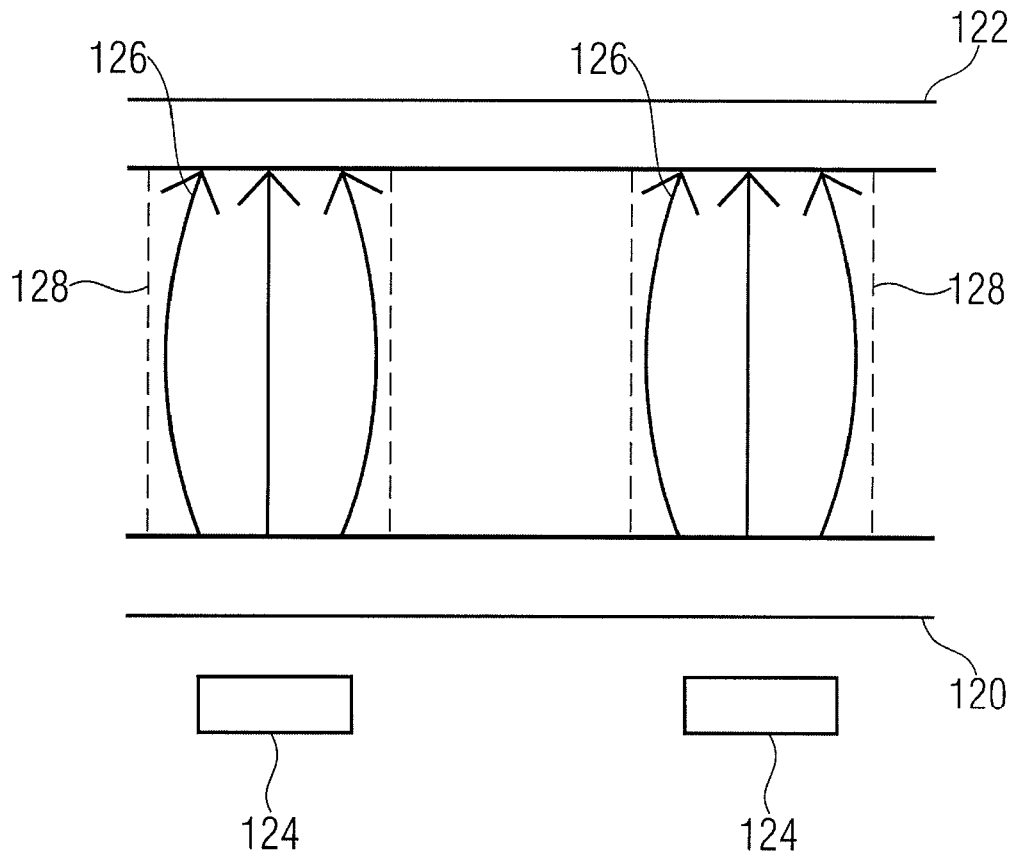


FIGURA 7