

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 145**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/GB2014/000232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14199113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14732279 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 3008207**

54 Título: **Método de almacenamiento de gotitas**

30 Prioridad:

13.06.2013 GB 201310584

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**BASE4 INNOVATION LTD (100.0%)
Broers Building, J. J. Thomson Avenue
Cambridge, Cambridgeshire CB3 0FA, GB**

72 Inventor/es:

FRAYLING, CAMERON ALEXANDER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 645 145 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

Método de almacenamiento de gotitas

5 La presente invención se refiere a un método de almacenamiento de gotitas sobre la superficie de un sustrato. En particular, se refiere al almacenamiento de gotitas de líquido, cada una de las cuales contiene uno o más nucleótidos u oligonucleótidos individuales. Este método es útil para el almacenamiento y la caracterización de grandes cantidades de microgotitas tales como las que pueden generarse en la secuenciación de un analito polinucleotídico obtenido a partir de ADN o ARN existente naturalmente o sintético.

10 Las nuevas tecnologías de secuenciación de material genético ya tienen un impacto significativo en las ciencias biológicas en general y en la medicina en particular a medida que se reduce el coste unitario de la secuenciación en sintonía con la llegada al mercado de máquinas de secuenciación cada vez más rápidas. Así, en una máquina de este tipo, un analito de ADN bicatenario es secuenciado indirectamente descomponiéndose en primer lugar en una pluralidad de fragmentos polinucleotídicos más pequeños, cada uno de los cuales se somete en primer lugar a adenilación en ambos extremos de una cadena de tal modo que un primer oligonucleótido monocatenario puede fijarse a ambos extremos de su complemento mediante hibridación a la base adenina no apareada. Los fragmentos tratados así obtenidos se seleccionan luego por tamaño y se capturan sobre una superficie recubierta con segundos oligonucleótidos monocatenarios fijados que son por sí mismos el complemento secuencial de los primeros de tal modo que puede crearse de hecho una biblioteca de fragmentos bicatenarios fijados a la superficie mediante hibridación adicional. En una etapa de agrupación subsiguiente, estos componentes de biblioteca se amplifican luego por clonación millones de veces sobre la superficie utilizando reacciones de extensión y formación isotérmica de puentes para utilizar los segundos oligonucleótidos no utilizados. Esto, de hecho, crea una concentración densa del fragmento polinucleotídico fijado a la superficie por una de sus cadenas. La cadena complementaria no fijada de cada fragmento se retira luego para dejar fragmentos monocatenarios fijados listos para la secuenciación. En la etapa de secuenciación, cada uno de estos fragmentos monocatenarios se ceba y se crea de nuevo su cadena complementaria por extensión utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y una mezcla de las cuatro bases nucleotídicas características del ADN en forma de didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP). Cada tipo de ddNTP está bloqueado en el extremo con un resto que está marcado con un fluoróforo diferente que emite fluorescencia a una longitud de onda diferente. La reacción de extensión adopta luego la forma de un ciclo de tres etapas; en primer lugar, el ddNTP relevante se incorpora a la cadena en crecimiento; en segundo lugar, la base nucleotídica que este contiene se identifica iluminando la muestra y detectando la longitud de onda de la fluorescencia y, finalmente, el bloque terminal y su fluoróforo asociado se retiran para permitir que tenga lugar el evento de extensión siguiente. De este modo, la secuencia de la cadena complementaria puede construirse base a base. Se apreciará que, si bien este enfoque puede ser en gran parte automatizado y puede generar lecturas de secuenciación de alta precisión, su velocidad de operación está limitada por la velocidad del ciclo de extensión. Así, en la práctica, el uso de la tecnología tiende a implicar un procesamiento paralelo de fragmentos polinucleotídicos relativamente cortos y el ensamblaje de la secuencia completa a partir de las diversas lecturas obtenidas de este modo. Esto en sí mismo puede conducir a complejidades computacionales y a la introducción potencial de errores.

40 Más recientemente, se han hecho esfuerzos en el desarrollo de métodos de secuenciación directa alternativos. Por ejemplo, el documento WO 2009/030953 divulga un nuevo secuenciador rápido en el que, entre otras cosas, la secuencia de bases o pares de bases nucleotídicas en una muestra de polinucleótido mono o bicatenario (por ejemplo, ARN o ADN existente naturalmente) se lee por translocación de la misma a través de un sustrato nanoporoso provisto de nanoestructuras plasmónicas yuxtapuestas en el interior de o adyacentes a la salida de los nanoporos. En este dispositivo, las nanoestructuras plasmónicas definen ventanas de detección (esencialmente un campo electromagnético) dentro de las cuales cada base nucleotídica (opcionalmente marcada) a su vez se ve inducida a emitir fluorescencia o dispersar fotones por efecto Raman de manera característica por interacción con la luz incidente. Los fotones así generados se detectan luego remotamente, se multiplexan y se convierten en un flujo de datos cuyo contenido de información es característico de la secuencia de bases nucleotídicas asociada con el polinucleótido. Esta secuencia puede recuperarse luego a partir del flujo de datos utilizando algoritmos computacionales materializados en un software correspondiente programado en un microprocesador integrado en el mismo o en un dispositivo de computación auxiliar unido al mismo. Antecedentes adicionales acerca del uso de nanoestructuras plasmónicas y sus características de resonancia asociadas pueden encontrarse, por ejemplo, en Adv. Mat. 2004, 16(19) págs. 1685-1706.

50 Se describe otro aparato para la secuenciación rápida de polinucleótidos, por ejemplo, en los documentos US6627067, US6267872 y US6746594. En su forma más simple, este dispositivo emplea electrodos, en lugar de nanoestructuras plasmónicas, para definir la ventana de detección a través del sustrato o en el interior o alrededor de la salida del nanoporo. Una diferencia de potencial se aplica luego a través de los electrodos y los cambios en las características eléctricas del medio iónico que fluye entre ellos, como consecuencia de la translocación electroforética del polinucleótido y el electrolito asociado a través del nanoporo, se miden en función del tiempo. En este dispositivo, a medida que las diversas bases nucleotídicas individuales atraviesan la ventana de detección, la bloquean y desbloquean constantemente, causando «eventos» que dan lugar a fluctuaciones características en el flujo de corriente o la resistividad. Estas fluctuaciones se utilizan luego para generar un flujo de datos adecuado para el análisis, como se ha descrito anteriormente.

La generación de corrientes estables de gotitas, especialmente corrientes de microgotitas, es otra área tecnológica en desarrollo que tiene ya aplicaciones en biología molecular. Por ejemplo, el documento US7708949 divulga un nuevo método microfluídico para generar gotitas de agua estables en aceite, mientras que, por ejemplo, el documento US2011/0250597 describe la utilización de esta tecnología para generar microgotitas que contienen una

5 plantilla de ácido nucleico (normalmente un fragmento polinucleotídico de ADN o ARN) y una pluralidad de pares de cebadores que hacen posible la amplificación de la plantilla utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Otras solicitudes de patente relacionadas con el campo incluyen en general los documentos JP2004/290977, JP2004/351417, US2012/0122714, US2011/0000560, US2010/01376163, US2010/0022414 y US2008/0003142.

10 El documento US 6277334 describe un aparato en el que la primera y la segunda gotita se introducen en pocillos de reacción después de atravesar un soporte de reacción poroso provisto de sitios de reacción en los que puede provocarse que ocurra la reacción entre los nucleótidos contenidos en la primera y la segunda gotita. Sin embargo, no se hace mención alguna a la generación de una corriente de las gotitas a partir de un fluido de gotitas y una corriente ordenada de nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor.

15 El documento US 2004/0197817 se refiere a un aparato para fabricar una red de polinucleótidos sobre un sustrato depositando gotitas que contienen el polinucleótido en un sustrato. De la misma manera, este aparato no se refiere a la impresión de una corriente de gotitas que comprende el fluido de gotitas y una corriente ordenada de nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor con el propósito de almacenar información de secuenciación.

20 El documento US 2010/0015614 describe un aparato para almacenamiento, amplificación y caracterización de material biológico basado en chip utilizando la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de microgotitas seguida del análisis por electroforesis capilar. El aparato incluye un sustrato plano que comprende uno o más microrreactores que se rellenan utilizando microgotitas que contienen, por ejemplo, un lisado derivado de una célula de una bacteria o virus. Sin embargo, no se proporciona información alguna acerca de generar una corriente de las gotitas a partir del fluido de gotitas y una corriente ordenada de nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor.

25 El documento EP 1933138 se refiere a un método para producir una red de sustratos de ensayo biológico depositando sobre la misma una pluralidad de sondas biológicas convencionales (oligonucleótidos y similares) utilizando un método de impresión de gotitas. Una vez más, no se proporciona información alguna acerca de generar una corriente de las gotitas a partir del flujo de gotitas y una corriente ordenada de nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor.

30 El documento US 2003/138831 se refiere a métodos de secuenciación de una biomolécula polimérica y a métodos de caracterización estructural de la misma utilizando aptámeros. En las realizaciones preferidas de la divulgación, estos métodos se refieren a la utilización de biomoléculas poliméricas individuales. El método no se refiere a generar una corriente de las gotitas a partir del fluido de gotitas y una corriente ordenada de nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor.

35 El documento US 5674743 proporciona un método y aparato de secuenciación de ADN. El método descrito en el mismo incluye las etapas de: a) utilizar una exonucleasa procesiva para escindir de una cadena de ADN simple el siguiente nucleótido individual disponible en la cadena; b) transportar el nucleótido individual fuera de la cadena de ADN; c) incorporar el nucleótido individual en una matriz de mejoramiento de fluorescencia; d) irradiar el nucleótido individual para provocar la fluorescencia en el mismo; e) detectar la fluorescencia; f) identificar el nucleótido individual por su fluorescencia; y g) repetir las etapas a) y f) hasta que la cadena de ADN sea escindida completamente o hasta que se secuencie una longitud deseada del ADN. La divulgación no proporciona información alguna acerca de generar una corriente de gotitas a partir del fluido de gotitas y una corriente ordenada de

40 nucleótidos individuales derivados de un analito polinucleotídico precursor.

45 Recientemente, en nuestras solicitudes previas GB1217772.1, GB1306444.9 y GB1306445.6 hemos descrito un nuevo método de secuenciación que implica pirofosforólisis progresiva o exonucleólisis de un polinucleótido para generar una corriente ordenada de nucleótidos que pueden ser capturados uno a uno en una correspondiente corriente de microgotitas. A partir de ahí, cada gotita puede ser manipulada química y/o enzimáticamente para revelar el nucleótido particular que contenía originalmente. Sin embargo, los análisis de los muchos millones de gotitas generadas potencialmente por dicho método requiere frecuentemente que las gotitas se almacenen durante un periodo de tiempo, mientras continúan las diversas reacciones químicas y/o biológicas que ocurren allí hasta completarse. Anteriormente, con fines de almacenamiento, hemos divulgado una cámara, a través de la que fluye la

50 corriente de gotitas, que está adaptada para capturar y retener las gotitas en un orden estricto. Sin embargo, aunque dicha cámara es adecuada cuando el polinucleótido que se está analizando es relativamente corto, su uso resulta problemático cuando se aplica a polinucleótidos más largos porque la gran cantidad de gotitas rápidamente conduce a una formación no deseada de contrapresión en la cámara que a su vez limita el flujo de la corriente de microgotitas.

Hemos desarrollado, por lo tanto, un método alternativo que de hecho implica el almacenamiento de las gotitas en ubicaciones discretas sobre la superficie de un sustrato donde pueden quedar retenidas hasta que estén listas para el análisis. Así, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de almacenamiento de una corriente de gotitas, al menos algunas de las cuales comprenden uno o más nucleótidos y/u oligonucleótidos individuales y un fluido de gotitas, caracterizado por la etapa de introducir cada gotita secuencialmente sobre una superficie de un sustrato en una ubicación única correspondiente y caracterizado además por que la corriente de gotitas se prepara mediante un proceso que incluye las etapas de generar una corriente ordenada de nucleótidos a partir del analito por pirofosforólisis progresiva y capturar cada nucleótido en una gotita correspondiente.

El sustrato sobre el que las gotitas se almacenan puede estar hecho en principio de cualquier material inerte incluido vidrio, polímeros, materiales compuestos y metales. En una realización, el sustrato es transparente a la radiación electromagnética especialmente a las frecuencias de luz visible o ultravioleta cercano, por ejemplo vidrio o un plástico transparente. En otra, puede reflejar dicha radiación electromagnética. Aún en otra realización, el sustrato es una lámina que tiene una superficie operativa que está yuxtapuesta por debajo de un sistema de suministro de gotitas. En esta realización, la superficie inmediatamente por debajo del sistema de suministro de gotitas puede o bien ser plana y no perfilada o bien puede estar provista de estructuras tales como ranuras, canales, pocillos, resaltes, hoyitos, agujeros, pilares y otras protuberancias que se adaptan o forman para facilitar la retención de las gotitas. En un ejemplo de esto, las estructuras comprenden una pluralidad de pocillos, ranuras o canales en la superficie operativa dispuestos normalmente como una red uniforme. Estos pocillos, ranuras o canales pueden tener cualquier forma siempre que sean lo suficientemente grandes como para albergar al menos parcialmente las gotitas y dejarlas inmóviles en una dirección paralela a la superficie operativa. En una realización, los pocillos son sustancialmente semiesféricos y tienen sus superficies internas recubiertas con material reflectante a la luz.

En otra realización preferida, partes de la superficie operativa del sustrato son tratadas física o químicamente para mejorar la adherencia de las gotitas a las mismas. En un ejemplo, esto puede lograrse haciendo que partes de la superficie sean hidrófilas o relativamente más hidrófilas que el resto; por ejemplo, cuando el sustrato sea una lámina de vidrio, mediante tratamiento plasmático o grabado de la superficie para generar grupos de iones hidroxilo o hidróxido en superficie en las ubicaciones en las que van a suministrarse las gotitas. En otra realización, partes de la superficie operativa se tratan para que sean hidrófobas, o relativamente más hidrófobas que otras partes. Así, la superficie operativa puede comprender un patrón o red de regiones hidrófilas sobre una superficie de lo contrario hidrófoba. En tales casos, las partes hidrófilas o relativamente más hidrófilas pueden corresponderse con algunas o todas las estructuras de superficie mencionadas anteriormente.

En otro ejemplo, partes de la superficie operativa se hacen químicamente funcionales o se dotan de un recubrimiento polimérico hidrófilo que las hace más pegajosas. En esta realización, el recubrimiento es, adecuadamente, o bien transparente a o bien reflectante de la radiación electromagnética de los tipos mencionados anteriormente. En otra realización preferida, la superficie operativa está provista de estructuras del tipo mencionado anteriormente y al menos algunas de estas estructuras son tratadas física o químicamente de manera selectiva para mejorar la adherencia de las gotitas a estas ubicaciones objetivo únicamente.

Cuando se aplican a la superficie operativa, y en cierta medida mientras están siendo aplicadas a la misma, las gotitas tienden a evaporarse. Esto es especialmente problemático cuando las microgotitas se emplean porque su relación entre área de superficie evaporativa y volumen interno es relativamente alta. Así, si bien las gotitas pueden aplicarse directamente a una superficie operativa no recubierta del sustrato, se preferirá en determinadas circunstancias que la superficie operativa esté recubierta con una película de un líquido que sea esencialmente no volátil a temperatura ambiente. De manera adecuada, el espesor de esta película debe ser mayor que el diámetro de la gotita para que, en su estado final almacenado, la gotita quede encapsulada totalmente por el líquido. Para facilitar esto, se prefiere que el líquido sea menos denso que el fluido de gotitas y tenga una viscosidad lo suficientemente baja como para que la gotita atraviese rápidamente la película hacia la superficie por la influencia de la gravedad.

Para preservar la integridad de la gotita, el líquido que comprende la película debe ser sustancial o completamente inmisible con el fluido de gotitas. Como el fluido de gotitas es normalmente un medio acuoso (por ejemplo, tampón de agua o acuoso), el líquido es, por lo tanto, preferentemente, uno que sea hidrófobo; por ejemplo un aceite de fluorocarbono, hidrocarburo o silicona. En otra realización, el líquido es un monómero o polímero que puede curarse para crear una matriz transparente sólida; por ejemplo mediante exposición al calor, a radiación ultravioleta o de microondas. Esta realización tiene la ventaja de que las gotitas quedan entonces atrapadas en la matriz dejándolas inmóviles y haciendo que el sustrato sea fácil de transportar, manipular y almacenar durante largos periodos.

Con respecto al sistema de suministro de gotitas, está diseñado o dispuesto con respecto a la superficie operativa del sustrato de modo que no se fusionen gotitas adyacentes en ninguna medida apreciable ya sea en el sistema en sí o sobre el sustrato. En una realización, el sistema de suministro de gotitas incluye una boquilla que tiene un diámetro interior y de orificio de salida similar al de las gotitas. En una versión preferida de esta realización, el diámetro interior de la boquilla en el orificio de salida tiene un perfil de sección transversal no circular, por ejemplo triangular, cuadrado, rectangular, en forma de un polígono regular, elipsoidal o similares, para facilitar la separación de las gotitas, de manera adecuada las microgotitas, del orificio de salida y la alimentación de líquido a la misma. De este modo, en determinadas circunstancias puede ser posible dispensar las gotitas desde el sistema de suministro

de gotitas sin necesidad de un medio portador del tipo descrito a continuación. En otra realización, y cuando las gotitas sean microgotitas, estas se suministran adecuadamente al orificio de salida mediante una vía microfluídica, tal como por conducción capilar. La superficie interna de esta vía microfluídica se hace hidrófoba de manera adecuada para impedir la adherencia de las gotitas a la misma. Después de emerger del sistema de suministro de gotitas, las gotitas caen por gravedad a través de la película de líquido hasta la superficie del sustrato en la ubicación deseada. Para minimizar aún más la evaporación, en una realización se prefiere que el orificio de salida del sistema de suministro de gotitas esté ubicado tan cerca como sea posible de la superficie de la película de líquido sin tocarla realmente. En otra realización, el orificio de salida está sumergido bajo la superficie de la película de líquido y preferentemente el diámetro interior de la boquilla en el orificio de salida tiene una sección transversal no circular, como se mencionó anteriormente.

Para permitir que distintas gotitas sean suministradas a diferentes ubicaciones únicas en el sustrato, la superficie operativa y el sistema de suministro de gotitas están adaptados para poder moverse el uno con respecto al otro. Para lograr esto, cualquiera de estos dos componentes puede moverse con respecto al otro fijo o ambos pueden ser móviles. De manera adecuada, es el sustrato el que es móvil y el sistema de suministro de gotitas el que es fijo. Este movimiento relativo, que se produce en al menos una, preferentemente dos, dimensiones espaciales, debe tener lugar en un plano paralelo al de la superficie operativa. Normalmente, este movimiento se efectuará utilizando métodos conocidos tales como una plataforma móvil que soporta el sustrato o el sistema de suministro de gotitas controlada por uno o más servomotores y un microprocesador. De manera adecuada, el microprocesador tendrá adicionalmente un sensor de ubicación y una memoria en la que puede almacenarse el orden y la ubicación de las gotitas para su posterior recuperación.

Las gotitas empleadas en el método de la presente son de manera adecuada microgotitas, es decir, gotitas que tienen un diámetro inferior a 50, preferentemente inferior a 20 micrómetros. Su forma generalmente estará determinada por el diseño exacto del aparato utilizado y, en diversos periodos de tiempo, puede ser, por ejemplo, esférica, esferoide achatada o elipsoidal. Al menos algunas de estas gotitas pueden contener uno o más nucleótidos y/u oligonucleótidos individuales. Normalmente, estos nucleótidos u oligonucleótidos comprenderán a su vez una o más marcas comunes en un estado detectable. De manera adecuada, la propiedad de detección asociada con estas marcas será la fluorescencia y se derivará de uno o más fluoróforos unidos a los nucleótidos u oligonucleótidos. Preferentemente, el fluido de gotitas es un medio acuoso.

Los nucleótidos y oligonucleótidos se generan de manera adecuada a partir de un analito polinucleotídico precursor, por ejemplo un fragmento de ADN o ARN existente naturalmente o sintético, mediante un proceso que incluye pirofosforólisis progresiva o degradación exonucleótica (exonucleólisis) del analito para generar una corriente ordenada de sus nucleótidos individuales constituyentes. En una realización, la ordenación de los nucleótidos individuales en la corriente corresponde a la secuenciación de nucleótidos en el analito. En otra, cuando el proceso implica pirofosforólisis progresiva de un analito de ADN o ARN, la corriente generada de nucleótidos individuales comprende respectivamente una corriente de desoxirribonucleósidos trifosfato o de ribonucleósidos trifosfato. En una realización de la divulgación, cuando se ha producida exonucleólisis progresiva de un analito de ADN o ARN, la corriente de nucleótidos individuales comprende respectivamente o bien una corriente de desoxirribonucleósidos monofosfato o bien una corriente de ribonucleósidos monofosfato. En cada uno de estos casos, la pirofosforólisis o exonucleólisis puede llevarse a cabo de manera adecuada en un medio acuoso que fluye de modo que los nucleótidos liberados se retiren continuamente de la zona de reacción. Posteriormente, y en una realización, la corriente que fluye que contiene los nucleótidos individuales puede convertirse en una corriente de gotitas acuosas suspendidas en un medio portador inmiscible; estando cada gotita vacía o conteniendo un nucleótido individual. En otra realización, el proceso completo se lleva a cabo de modo que el orden de los nucleótidos individuales en esta corriente de gotitas se corresponda con el orden y, por tanto, con la secuencia original de estos nucleótidos en el analito. Posteriormente, cada gotita en la corriente puede someterse a una o más transformaciones químicas o biológicas; por ejemplo mediante la introducción de los agentes químicos o enzimas necesarios en las mismas en diversos puntos en el flujo de gotitas. En una realización de este proceso, cada gotita es tratada para capturar el nucleótido que contiene con una molécula de captura que está marcada de forma múltiple con fluoróforos. Aquí, los fluoróforos están dispuestos en la molécula de captura de modo que no puedan detectarse cuando la molécula de captura se encuentre en un estado no utilizado; por ejemplo mediante la inclusión adicional de inactivadores en estrecha proximidad con los mismos o por inactivación mutua de fluoróforos. Posteriormente, una vez capturado el nucleótido, la «molécula de captura utilizada» se vuelve susceptible a la degradación enzimática que libera una cascada de nucleótidos libres de marcado cuya fluorescencia asociada puede entonces detectarse. En otra realización del proceso, cada gotita es tratada para crear amplicones marcados característicos del nucleótido que contenía originalmente. En este caso, el nucleótido preferentemente es capturado y la molécula de captura utilizada resultante se amplifica para generar una pluralidad de amplicones correspondientes utilizando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, la amplificación de la polimerasa recombinasa o amplificación en círculo rodante. Posteriormente, cada amplicón puede marcarse de manera fluorescente utilizando balizas moleculares o similares. Pueden encontrarse más detalles acerca de estos enfoques en nuestras diversas solicitudes de patente enumeradas anteriormente, a cuyo objeto se remite en el presente documento.

En una realización particular, que es especialmente útil cuando los nucleótidos individuales son desoxirribonucleósidos trifosfato, la molécula de captura comprende un par de oligonucleótidos en forma de i y j al

menos uno de los cuales está marcado con fluoróforo(s) y opcionalmente inactivador(es). Ante la presencia del nucleótido individual, estos pares pueden ensamblarse dando lugar a una molécula capturada de oligonucleótido bicatenario que se marca de igual manera. En otra realización de la divulgación, esta molécula capturada marcada es escindida en un sitio de reconocimiento utilizando, por ejemplo, una endonucleasa de restricción para generar productos que a su vez pueden someterse a exonucleólisis posterior para liberar una cascada de nucleótidos individuales marcados derivados de la molécula capturada cuya fluorescencia asociada puede detectarse posteriormente. En una realización, es el componente en forma de *i* del par de moléculas de captura el que está marcado, en otra es el componente en forma de *j* el que está marcado y aún en otra ambos componentes están marcados. En una realización final, la molécula de captura comprende uno o más de los diversos sistemas divulgados en nuestras solicitudes de patente PCT/GB2013/052594 (publicada como WO 2014/053853) y PCT/GB2013/052595 (publicada como WO 2014/053854), a cuyos contenidos, y en particular las características estructurales de la molécula de captura, se remite en el presente documento.

Las gotitas pueden suspenderse opcionalmente en un medio portador. El medio portador es de manera adecuada uno que sea inmisible con el fluido de gotitas y que preferentemente esté compuesto del mismo material que la película de líquido o al menos que sean miscibles. En una realización, la película de líquido está formada por el medio portador que se descarga a través del sistema de suministro de gotitas al mismo tiempo que las propias gotitas. En una realización adicional de esto, un medio portador original puede reemplazarse en algún punto en o aguas arriba del sistema de suministro de gotitas por un medio más ventajoso por lo que respecta al análisis de las gotitas; por ejemplo un portador que sea en sí mismo menos susceptible a la fluorescencia.

En otra realización, las gotitas que contienen los nucleótidos individuales originales del analito polinucleotídico primero son suministradas a la superficie operativa y luego son tratadas con las diversas moléculas de captura, agentes químicos y enzimas requeridos para efectuar las diversas transformaciones químicas y biológicas descritas anteriormente. En este caso, las moléculas de captura, los agentes químicos y las enzimas necesarios pueden añadirse a las gotitas suministradas, por ejemplo, por inyección directa en las mismas y/o añadiendo más gotitas que contengan estos materiales sobre las gotitas ya suministradas en condiciones en las que pueda producirse fusión.

Una vez que el sustrato se ha rellenado con gotitas, puede almacenarse hasta que vaya a investigarse el contenido de las gotitas. Si el contenido va a analizarse mediante la medición de la fluorescencia que emite, esto puede realizarse, por ejemplo, irradiando sucesivamente cada gotita con una fuente enfocada de radiación electromagnética, es decir, desde un láser montado sobre un conjunto móvil, y posteriormente midiendo las emisiones de fluorescencia de cada una a una o más frecuencias características utilizando un detector de fotones. De este modo, el detector de fotones puede generar una señal, característica de la secuencia del analito polinucleotídico, que luego puede alimentarse a un microprocesador o PC independiente para el análisis computacional.

El método de la presente invención puede llevarse a cabo ventajosamente utilizando un dispositivo de almacenamiento de microgotitas caracterizado por comprender:

- un sustrato que tiene una superficie operativa;
- un medio para generar una corriente de microgotitas que incluye la etapa de generar una corriente ordenada de nucleótidos individuales a partir de un analito polinucleotídico mediante pirofosforólisis progresiva;
- un sistema de suministro de gotitas que comprende una boquilla y un orificio de salida para suministrar una corriente de microgotitas, al menos algunas de las cuales contienen uno o más nucleótidos y/u oligonucleótidos, en una ubicación única correspondiente sobre la superficie operativa;
- un medio para suministrar la corriente de microgotitas opcionalmente en un medio portador a una entrada del sistema de suministro de gotitas y
- un mecanismo de ubicación para mover uno o ambos del sustrato y el sistema de suministro de gotitas en relación con el otro en el plano de la superficie operativa.

De manera adecuada, el sustrato utilizado en el dispositivo de la presente invención comprende una superficie plana, por ejemplo una placa o lámina plana, que tiene una superficie operativa yuxtapuesta frente al orificio de salida del sistema de suministro de gotitas. Preferentemente, el sustrato, y su superficie operativa, están diseñados de acuerdo con una o más de las realizaciones enumeradas anteriormente y está montado de manera adecuada sobre una plataforma fija o móvil. En una realización, la superficie operativa es recubierta previamente con una película de líquido, según se describió anteriormente, antes de su uso. Del mismo modo, el sistema de suministro de gotitas está diseñado de acuerdo con una o más de las realizaciones enumeradas anteriormente y está montado sobre una plataforma fija o móvil. En una realización, la plataforma que soporta el sustrato es móvil y la plataforma que soporta el sistema de suministro de gotitas es fijo. En otra, la plataforma que soporta el sustrato es fija y la plataforma que soporta el sistema de suministro de gotitas es móvil. Aún en otra realización, ambas plataformas son móviles una con respecto a otra. Las plataformas pueden ser móviles ellas mismas en una o ambas dimensiones que definen el plano de la superficie operativa.

El medio para suministrar la corriente de microgotitas al sistema de suministro de gotitas está compuesto, de manera adecuada, por una o por una red de vías microfluídicas unidas directa o indirectamente a una entrada o a un sistema

de suministro de gotitas. De manera adecuada, las vías microfluídicas están adaptadas para suministrar las microgotitas al sistema de suministro de gotitas dispersadas en un medio portador inmiscible del tipo descrito anteriormente. En una realización, las vías microfluídicas están compuestas por una red de tubos, conductos o similares, microfluídicos, conectados con una primera zona; por ejemplo una cámara o conexión microfluídica, en la que las microgotitas se crean mediante un orificio de generación de gotitas en el que puede hacerse que el fluido de gotitas (normalmente acuoso) salga hacia un medio portador. En otra realización, además de esta primera zona, las vías microfluídicas pueden comprender además una o una pluralidad de zonas secundarias, por ejemplo, cámara(s), conexiones microfluídicas o puntos de inyección, en los que cualquiera, algunas o todas las permutaciones de los nucleótidos, oligonucleótidos, molécula(s) de captura y los diversos agentes químicos y enzimas a los que se hizo referencia anteriormente pueden introducirse en las microgotitas: por ejemplo por inyección directa en el fluido de gotitas o por fusión de gotitas con una o más corrientes de microgotitas secundarias. La vías microfluídicas puede estar provistas de uno o más calentadores y/o enfriadores en diversos puntos a lo largo de su longitud para permitir el control de la temperatura de la corriente de microgotitas. También puede estar provista de una o más zonas terciarias en las que el medio portador puede intercambiarse por otro. De manera adecuada, la vía microfluídica está hecha de plástico y la corriente de microgotitas se mueve a través de la misma mediante una o más bombas. La vía microfluídica puede estar provista de vías microfluídicas auxiliares para que pueda limpiarse periódicamente mediante enjuague.

El mecanismo de ubicación comprende de manera adecuada una plataforma y uno o más motores que permiten posicionar la superficie operativa del sustrato y el orificio de salida con precisión uno con respecto a otro de manera inmediata en el plano de la superficie operativa antes de hacer que una microgotita salga desde el segundo. De manera adecuada, el dispositivo está provisto de medios para almacenar la ubicación exacta en el plano que define la superficie operativa en la que se ha suministrado una determinada microgotita de modo que cada punto de información pueda recuperarse con posterioridad. De manera adecuada, el mecanismo de ubicación es servoasistido.

En una realización, este dispositivo puede comprender una carcasa que contiene el sistema de suministro de gotitas y una cámara adaptada para recibir y eyectar el sustrato. El dispositivo puede además comprender opcionalmente un medio para introducir y eyectar una serie de sustratos secuencialmente dentro y fuera de la cámara; por ejemplo mediante una disposición de carrusel y/o cartucho. En otra realización, el dispositivo también puede incluir opcionalmente una unidad de análisis que comprende una fuente de radiación electromagnética y un detector de fotones montados sobre un conjunto móvil. Aún en otra, el dispositivo también puede incluir opcionalmente un microprocesador vinculado a uno o más del sistema de suministro de gotitas, la fuente de radiación electromagnética (por ejemplo un láser) y el detector de fotones. El sistema de suministro de gotitas está vinculado o enlazado de manera adecuada a un secuenciador de gotitas que emplea uno de los procesos descritos anteriormente. En una realización, los medios para generar las microgotitas están realizados en un chip y los productos de los mismos se suministran microfluídicamente al sistema de suministro de gotitas para la impresión sobre el sustrato.

A continuación se ilustra el método con referencia al siguiente ejemplo en el que:

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un secuenciador en el que se someten microgotitas, cada una de las cuales contiene un nucleótido, a reacción con un sistema de captura para generar amplicones marcados de manera fluorescente.

La Figura 2 ilustra una vista en sección de un dispositivo de almacenamiento de gotitas que emplea el método de la presente invención.

Generación de una corriente de microgotitas, cada una de las cuales contiene oligonucleótidos

Un medio acuoso 1 que comprende una corriente de nucleótidos individuales (desoxirribonucleósidos trifosfato) obtenida por la pirofosforólisis progresiva de un analito polinucleotídico de 100 bases nucleotídicas derivado de ADN humano se hace fluir a través de un tubo microfluídico de diez micrómetros de diámetro fabricado de polímero PDMS. La reacción de pirofosforólisis propiamente dicha se lleva a cabo haciendo pasar una corriente de un medio de reacción acuoso, tamponado (pH 8) a 72 °C, que comprende *Taq Pol* y una concentración de 2 milimoles por litro de cada uno de pirofosfato de sodio y cloruro de magnesio, sobre una microperla de vidrio a la cual se ha fijado previamente el analito por medio de un puente succinilo. El orden de los nucleótidos en 1, que se encuentra aguas abajo de la microperla, corresponde a la secuencia del analito. 1 emerge de un cabezal de gotitas 2 hacia una primera cámara 3 en la que entra en contacto con una o más corrientes de aceite de silicona 4 ligero inmiscible. Las velocidades de estas corrientes se seleccionan a fin de evitar una mezcla turbulenta y para crear gotitas 5 esféricas acuosas suspendidas en el aceite, cada una de las cuales tiene un diámetro de aproximadamente ocho micrómetros.

Normalmente, las velocidades se ajustan de modo que entre gotitas adyacentes llenas existan de media 10 vacías.

Una corriente de 5 se hace avanzar luego a lo largo de un segundo tubo microfluídico del mismo diámetro a una velocidad de 1000 gotitas por segundo hasta una segunda cámara 6 a la cual una segunda corriente de gotitas 7 esféricas acuosas de cinco micrómetros se alimenta también por medio de un segundo cabezal de gotitas 8. Las gotitas 5 y 7 se fusionan de manera secuencial para formar gotitas 9 acuosas agrandadas de aproximadamente

nueve micrómetros de diámetro. Cada una de 7 contiene pirofosfatasa para destruir cualquier anión pirofosfato residual presente en cada una de 5.

5 Se hace avanzar luego una corriente de 9 a la misma velocidad por el tubo microfluídico hasta una tercera cámara 10 en la que estas gotitas se ponen en contacto con una tercera corriente de gotitas 11 esféricas acuosas de cinco micrómetros alimentadas también a la misma por un cabezal de gotitas 12 correspondiente. El tiempo requerido para que cada una de 9 se desplace entre las cámaras 6 y 10 es de aprox. 2 minutos.

10 Las gotitas 9 y 11 se fusionan luego en 10 para producir gotitas 13 (de aproximadamente diez micrómetros de diámetro). Cada una de 11 contiene una ligasa mesófila y un sistema de captura que comprende cuatro pares de primeros oligonucleótidos en forma de j y cuatro segundos oligonucleótidos monocatenarios en forma de i correspondientes. Cada primer oligonucleótido en forma de j tiene una longitud de 60 bases nucleotídicas y se prepara por plegado de un precursor oligonucleotídico monocatenario de 60 bases nucleotídicas alrededor de la base nucleotídica 45 desde el extremo 5' para generar un bucle monocatenario de 3 nucleótidos, una región bicatenaria de 12 pares de bases nucleotídicas y una región monocatenaria de 33 bases nucleotídicas que es diferente en cada uno de los cuatro primeros oligonucleótidos. Cada uno de estos cuatro primeros oligonucleótidos también tiene una base 33 diferente (medida desde el extremo monocatenario) característica de los cuatro tipos de bases nucleotídicas características del ADN (es decir, A, T, G y C). Los cuatro segundos oligonucleótidos en forma de i diferentes tienen cada uno una longitud de 28 bases nucleotídicas y tienen secuencias diferentes que son complementarias a esa parte de la región monocatenaria definida por las bases nucleotídicas 4 y 32 de su primer par de oligonucleótidos.

25 Una corriente de 13 se hace avanzar a continuación a la misma velocidad por un tubo microfluídico en el que después de treinta minutos atraviesa un punto crítico, en el que se provoca la desactivación de la ligasa (de diez a veinte minutos), antes de entrar en una tercera cámara 14 en la que se provoca la fusión con una cuarta corriente de gotitas 15 esféricas acuosas de cinco micrómetros, alimentada también a la misma a través de un cabezal de gotitas 16. Cada una de 15 contiene cuatro pares de cebadores selectivos diferentes para cada uno de los segundos oligonucleótidos, enzima *Taq Pol*, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato característicos del ADN y cuatro balizas moleculares diferentes selectivas para cada uno de los cuatro tipos de amplicones que pueden generarse a partir de los cuatro tipos de moléculas capturadas diferentes que pueden producirse en 13. 15 también puede contener otros aditivos empleados normalmente al llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa. La corriente de las microgotitas 17 fusionadas así formada se somete luego a entre 20 y 30 ciclos térmicos de entre 60 °C y 95 °C (un ciclo por minuto) tiempo durante el cual tiene lugar la amplificación de las moléculas de captura abiertas por la reacción en cadena de la polimerasa. Al finalizar este tiempo, 17 se transfiere al almacenamiento.

35 Almacenamiento de las microgotitas

17 se introduce en el sistema de suministro de microgotitas 18 con un diámetro interior 19 capilar sellado que conduce a un orificio de salida 20 desde el que las microgotitas 21 emergen una a una. El sustrato 22 comprende una lámina de vidrio cuya superficie operativa tiene un patrón con una red bidimensional regular de pocillos semiesféricos 23. Las superficies internas de 23 están grabadas previamente por tratamiento plasmático. 22 está recubierto sobre su superficie operativa con una película fina de aceite de silicona 24 ligero y sobre su otra superficie con una capa de metal reflectante 25 ligera. 22 está montado sobre una plataforma 26 que es móvil en el plano paralelo a su superficie operativa mediante un microprocesador y servomotores (no mostrados). Cuando está en uso, cada una de 21 emerge secuencialmente de 20 en una ubicación única establecida por el movimiento de 26 y caen por la gravedad a través de 24 a 23 en donde se almacenan bajo el aceite. Cuando llega el momento de analizar las microgotitas, cada pocillo se ilumina sucesivamente utilizando un láser y cualquier fluorescencia reflejada se mide por un fotodetector conectado a un ordenador (no mostrado).

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de almacenamiento de una corriente de gotitas, al menos algunas de las cuales comprenden uno o más nucleótidos y/u oligonucleótidos individuales, y un fluido de gotitas, caracterizado por la etapa de introducir cada gotita secuencialmente sobre una superficie de un sustrato en una ubicación única correspondiente y caracterizado además porque la corriente de gotitas se prepara mediante un proceso que incluye las etapas de generar una corriente ordenada de nucleótidos a partir del analito por pirofosforólisis progresiva y capturar cada nucleótido en una gotita correspondiente.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por que las gotitas son introducidas sobre la superficie en condiciones que impiden que se fusionen.
- 15 3. Un método según la reivindicación 2, caracterizado por que la superficie del sustrato está provista de una pluralidad de pocillos, ranuras, canales, resaltes, hoyitos, agujeros, pilares u otras protuberancias, en los que se introducen las gotitas.
- 20 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la superficie está recubierta con una película de líquido que es inmisible con el fluido de gotitas.
- 25 5. Un método según la reivindicación 4, caracterizado por que el líquido que comprende la película es menos denso que el fluido de gotitas.
6. Un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, caracterizado por que la viscosidad del líquido que comprende la película permite que las gotitas migren a través del mismo a la superficie del sustrato.
- 30 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que el fluido de gotitas es un tampón de agua o acuoso y el líquido que comprende la película se selecciona del grupo que consiste en aceites de fluorocarbono, aceites de hidrocarburo, aceites de silicona o monómeros o polímeros líquidos que pueden curarse para formar una matriz transparente sólida mediante la acción del calor o radiación uv.
- 35 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que al menos parte de la superficie del sustrato se adapta para ser relativamente más hidrófila que el resto.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las gotitas son introducidas sobre la superficie del sustrato mediante un sistema de suministro de gotitas.
- 40 10. Un método según la reivindicación 9, caracterizado por que el sistema de suministro de gotitas incluye una boquilla que comprende un orificio de salida que tiene un perfil de sección transversal no circular.
- 45 11. Un método según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, caracterizado por que el sistema de suministro de gotitas y la superficie del sustrato son móviles uno con respecto a otro en al menos una dimensión espacial.
12. Un método según la reivindicación 11, caracterizado por que el movimiento relativo del sistema de suministro de gotitas y la superficie del sustrato es controlado por un microprocesador y un mecanismo servoasistido.
- 50 13. Un método según la reivindicación 12, caracterizado por que el microprocesador está provisto de memoria para almacenar el orden y la ubicación de cada gotita.
- 55 14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado por que las gotitas son suministradas al sistema de suministro de gotitas en forma de un medio portador que contiene una corriente de gotitas, al menos algunas de las cuales contienen los nucleótidos u oligonucleótidos.
15. Un método según la reivindicación 14, caracterizado por que el medio portador y el líquido que comprende la película son iguales.
- 60 16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los nucleótidos u oligonucleótidos contenidos en las gotitas están marcados con uno o más fluoróforos.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la corriente de gotitas tiene un orden de nucleótidos correspondiente al de la secuencia de nucleótidos en un analito polinucleotídico precursor.
- 65 18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el proceso comprende la etapa adicional de tratar cada gotita para capturar el nucleótido con una molécula de captura, marcada de forma múltiple con fluoróforos en un estado inactivo, que tras la captura se somete a degradación enzimática.

19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el proceso comprende la etapa adicional de tratar cada gotita para crear los amplicones marcados característicos del nucleótido que contiene.
- 5 20. Un método según la reivindicación 19, caracterizado por que los amplicones son creados por un método seleccionado del grupo que consiste en la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación de la polimerasa recombinasa y amplificación en círculo rodante.
- 10 21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizado por que (1) al menos algunas de las gotitas contienen nucleótidos individuales derivados del analito y (2) dichas gotitas son suministradas a la superficie operativa del sustrato antes de que se lleve a cabo al menos una de las etapas adicionales reivindicadas en las reivindicaciones 18 a 20.
22. Un dispositivo de almacenamiento de microgotitas, caracterizado por comprender
- 15 a. un sustrato que tiene una superficie operativa;
- b. un medio para generar una corriente de microgotitas que incluye la etapa de generar una corriente ordenada de nucleótidos individuales a partir de un analito polinucleotídico mediante pirofosforólisis progresiva;
- 20 c. un sistema de suministro de gotitas que comprende una boquilla y un orificio de salida para suministrar la corriente de microgotitas, al menos algunas de las cuales comprenden uno o más nucleótidos y/u oligonucleótidos individuales, en una ubicación única correspondiente sobre la superficie operativa;
- d. un medio para suministrar la corriente de microgotitas opcionalmente en un medio portador a una entrada del sistema de suministro de gotitas y
- 25 e. un mecanismo de ubicación para mover uno o ambos del sustrato y el sistema de suministro de gotitas con respecto al otro en el plano de la superficie operativa.
23. Un dispositivo de almacenamiento de microgotitas según la reivindicación 22, caracterizado por que el medio para suministrar la corriente de microgotitas al sistema de suministro de gotitas comprende una vía microfluídica.
- 30 24. Un dispositivo de almacenamiento de microgotitas según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, caracterizado por que además comprende un medio para almacenar la ubicación exacta en el plano que define la superficie operativa en la que se ha suministrado una microgotita determinada.
- 35 25. Un dispositivo de almacenamiento de microgotitas según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizado por que la superficie operativa está recubierta previamente con una película de líquido antes de su uso.
- 40 26. Un dispositivo de almacenamiento de microgotitas según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, que comprende una carcasa que contiene el sistema de suministro de gotitas y una cámara adaptada para recibir y eyectar el sustrato.

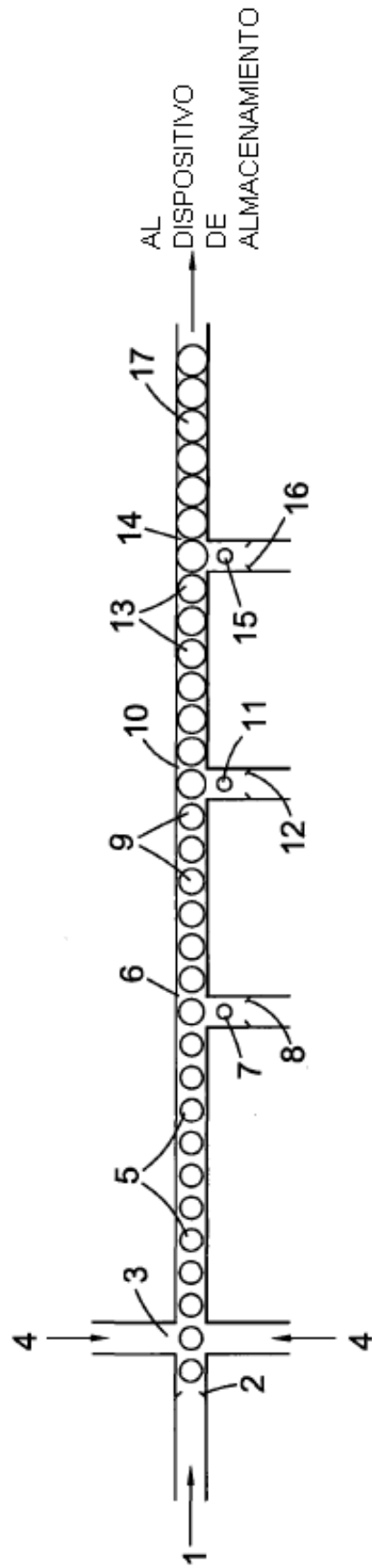


Fig. 1

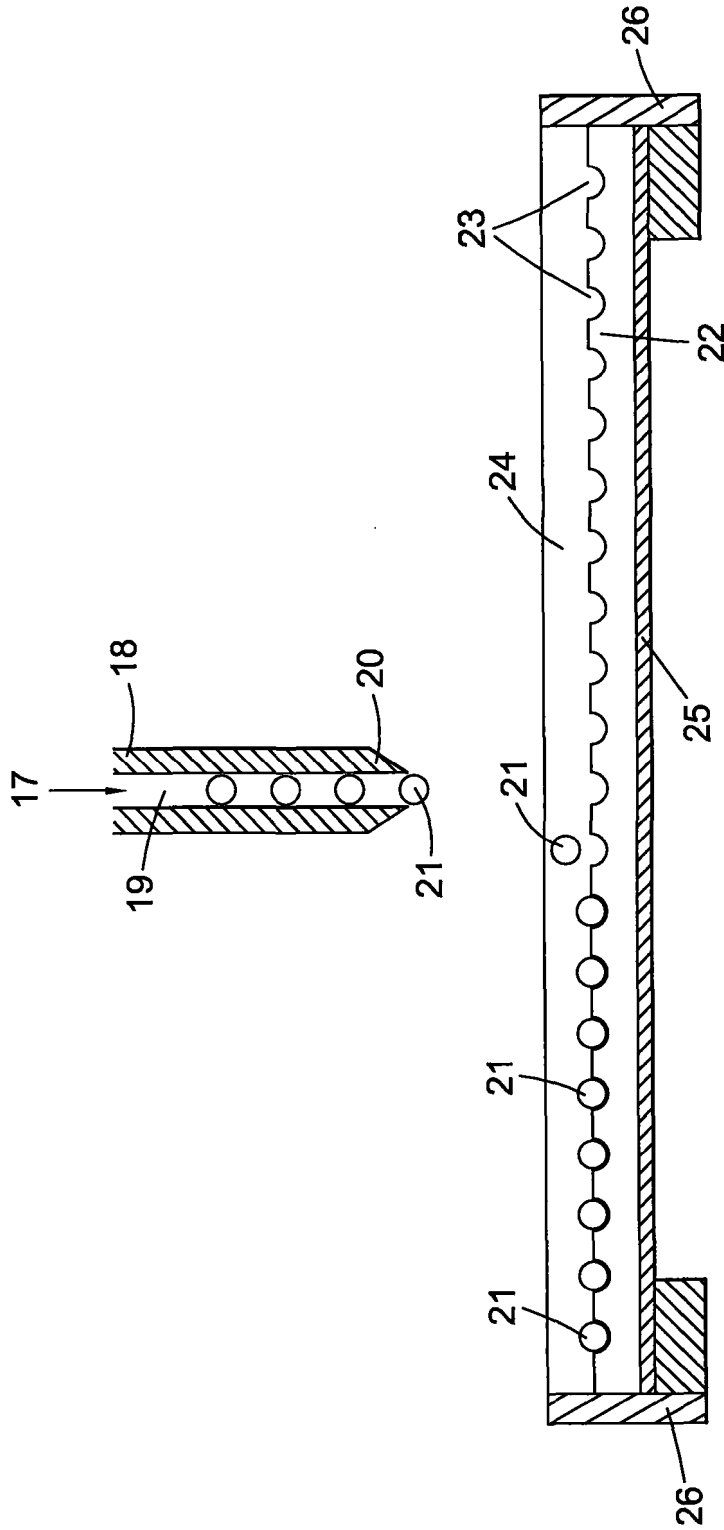


Fig. 2