

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 439**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 21/00</b>	(2006.01)	<b>C40B 60/14</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/00</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/543</b>	(2006.01)		
<b>C08K 3/00</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)		
<b>C12M 1/34</b>	(2006.01)		
<b>B01J 19/00</b>	(2006.01)		
<b>G03F 7/20</b>	(2006.01)		
<b>G02B 26/08</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.1999** **E 10001599 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2180309**

54 Título: **Aparato para síntesis de matrices de sondas de ADN**

30 Prioridad:

**23.02.1998 US 75641 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2018**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)  
614 NORTH WALNUT STREET POST OFFICE  
BOX 7365  
MADISON, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**CERRINA, FRANCESCO;  
SUSSMAN, MICHAEL, R.;  
BLATTNER, FREDERICK, R.;  
SINGH-GASSON, SANGEET y  
GREEN, ROLAND**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 656 439 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Aparato para síntesis de matrices de sondas de ADN

5 **Campo de la invención**

Esta invención pertenece, de forma general, al campo de la biología y concretamente a un aparato para su uso en la síntesis de matrices de sondas de ADN, polipéptidos y similares.

10 **Antecedentes de la invención**

La secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es una herramienta fundamental de la biología moderna y convencionalmente se lleva a cabo de diversas maneras, comúnmente por procedimientos que separan segmentos de ADN mediante electroforesis. Véase, por ejemplo, Current Protocols In Molecular Biology, Volumen 1, capítulo 7, "DNA Sequencing", 1995. Ya se ha completado la secuenciación de varios genomas importantes (por ejemplo, levadura, E. coli), y se está procediendo a trabajar en la secuenciación de otros genomas de importancia médica y agrícola (por ejemplo, C. elegans, Arabidopsis). En el contexto médico, será necesario "re-secuenciar" el genoma de gran número de individuos humanos para determinar qué genotipos están asociados con qué enfermedades. Tales técnicas de secuenciación se pueden usar para determinar qué genes son activos y cuales inactivos en tejidos específicos, tales como cánceres, o bien, de forma más general, en individuos que exhiben enfermedades influenciadas por la genética. Los resultados de tales investigaciones pueden permitir la identificación de las proteínas que son buenos objetivos para los nuevos fármacos o para la identificación de alteraciones genéticas apropiadas que puedan ser eficaces en la terapia genética. Otras aplicaciones se encuentran en campos tales como la ecología o la patología del terreno, donde será deseable ser capaces de aislar el ADN de cualquier muestra de terreno o de tejido, y usar sondas procedentes de secuencias de ADN ribosómico de todos los microbios conocidos para identificar los microbios presentes en la muestra.

La secuenciación convencional del ADN usando electroforesis es generalmente laboriosa y necesita tiempo. Se han propuesto diversas alternativas a la secuenciación convencional del ADN. Una de estas aproximaciones alternativas, que utiliza una matriz de sondas de oligonucleótidos sintetizados mediante técnicas fotolitográficas, está descrita por Pease y colaboradores, "Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis", Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU. Volumen 91, páginas 5022-5026, Mayo 1994. En esta aproximación, se ilumina la superficie de un soporte sólido, modificado con grupos protectores fotolábiles, a través de una máscara fotolitográfica, produciendo grupos hidroxilo reactivos en las regiones iluminadas. Se le proporciona luego a la superficie un desoxinucleósido activado en posición 3', protegido en el hidroxilo 5' con un grupo fotolábil, de forma que se produzca un acoplamiento en los sitios que han estado expuestos a la luz. A continuación de la adición de la estructura casquete, y de la oxidación, el sustrato se enjuaga y la superficie se ilumina a través de una segunda máscara para exponer los grupos hidroxilo adicionales al acoplamiento. Se presenta a la superficie una segunda base de desoxinucleósido activado protegido en 5'. Los ciclos de fotodesprotección selectiva y acoplamiento se repiten para aumentar los niveles de bases hasta que se obtenga el conjunto de sondas deseado. Puede ser posible generar matrices miniaturizadas de sondas de oligonucleótidos, de alta densidad, usando estas técnicas fotolitográficas, en las que se conoce la secuencia de las sondas de oligonucleótidos en cada uno de los sitios de la matriz. Estas sondas se pueden usar luego para buscar secuencias complementarias sobre una cadena antiparalela de ADN, con la detección del antiparalelo que ha hibridado a sondas concretas llevado a cabo mediante el uso de marcadores fluorescentes acoplados a los antiparalelos, y la inspección mediante un apropiado microscopio de fluorescencia con barrido. McGall y colaboradores, en "Light-Directed Synthesis of High-Density Oligonucleotide Arrays Using Semiconductor Photoresists", Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., Volumen 93, páginas 13555-13560, Noviembre de 1996, y G. H. McGall y colaboradores en "The Efficiency of Light-Directed Synthesis of DNA Arrays on Glass Substrates", Journal of the American Chemical Society 119, nº 22, 1997, páginas 5081-5090, describen una variación de este procedimiento que usa sustancias fotoprotectoras semiconductoras poliméricas que se configuran selectivamente mediante técnicas fotolitográficas, en vez de usar grupos protectores fotolábiles 5'.

Un inconveniente de ambas aproximaciones es que se necesitan cuatro máscaras litográficas diferentes para la base monomérica, y el número total de máscaras diferentes requeridas es, por tanto, cuatro veces la longitud de las secuencias de las sondas de ADN que se van a sintetizar. El alto coste para producir las muchas máscaras fotolitográficas de precisión que se requieren, y las múltiples etapas de tratamiento requeridas para volver a colocar las máscaras para cada exposición, contribuyen a los costes relativamente altos y a los largos tiempos de tratamiento.

El documento WO 93/22678 describe un aparato para identificar estructuras moleculares dentro de una sustancia de muestra que usa una matriz monolítica de puntos de ensayo formados sobre un sustrato sobre el que se aplica la sustancia de muestra. Cada punto de ensayo incluye sondas allí formadas para unirse con una estructura o estructuras moleculares diana predeterminadas. Se aplica una señal a los lugares de ensayo y se detectan ciertas propiedades eléctricas, mecánicas y/o ópticas de los lugares de ensayo para determinar qué sondas se han unido a una estructura molecular diana asociada.

## Sumario de la invención

Según la presente invención se proporciona un aparato como se define en la reivindicación independiente.

5 Según la presente invención, la síntesis de las matrices de secuencias de sondas de ADN, polipéptidos, y similares, se puede llevar a cabo rápidamente y de forma eficaz usando procedimientos de formación de patrones. El procedimiento puede estar automatizado y controlado por ordenador para permitir la fabricación de una matriz uni- o bidimensional de sondas que contienen secuencias de la sonda adaptadas a una investigación concreta. No se requieren máscaras litográficas, eliminando de esta forma los costes significativos y los retrasos de tiempo asociados a la producción de las máscaras litográficas y evitando la manipulación y la alineación de las múltiples máscaras, lo que necesita tiempo, durante el proceso de fabricación de las matrices de sondas.

15 En la presente invención, se usa un sustrato con una superficie activa a la que se han aplicado grupos conectores en la síntesis de ADN para hacer de soporte de las sondas que se van a fabricar. Para activar la superficie activa del sustrato, con el fin de proporcionar el primer nivel de las bases, se proyecta sobre el sustrato una imagen luminosa bidimensional de alta precisión, iluminando aquellos lugares de la matriz que tiene elementos de una imagen sobre la superficie activa del sustrato que se van a activar para unirse a una primera base. La luz incidente sobre los lugares de la matriz que tiene elementos de una imagen a los que se les aplica la luz, desprotege los grupos OH y hace que estén disponibles para unirse a las bases. Después de esta etapa de revelado, se proporciona a la superficie activa del sustrato un fluido que contiene la base apropiada, y la base seleccionada se une a la base apropiada unida al mismo. Las bases unidas al sustrato se pueden proteger, o bien con una sustancia química capaz de unirse a la base, o con una capa de sustancias fotoprotectoras que cubren la totalidad de las bases unidas, y se puede proyectar luego un nuevo patrón matricial y se forma la imagen sobre el sustrato para activar el material protector en aquellos lugares que tiene elementos de una imagen a los que se va a añadir la primera nueva base. Estos lugares que tienen elementos de una imagen se exponen luego y se aplica a la matriz una solución que contiene la base seleccionada, de forma que la base se une a los lugares expuestos que tienen elementos de una imagen. Este procedimiento se repite luego para todos los otros lugares que tienen elementos de una imagen en el segundo nivel de bases. El procedimiento descrito se puede repetir luego para cada uno de los niveles de bases deseados hasta que se haya completado toda la matriz bidimensional de secuencias de sondas seleccionadas.

20 La imagen se puede proyectar sobre el sustrato que utiliza un sistema formador de imagen que tiene una fuente de luz apropiada, la cual proporciona luz a un dispositivo de microespejos que comprende una matriz bidimensional de microespejos que se pueden orientar electrónicamente, cada uno de los cuales puede inclinarse selectivamente entre una de al menos dos posiciones separadas. En una de las posiciones de cada microespejo, la luz procedente de la fuente que incide sobre el microespejo, se desvía separándose del eje óptico, y alejándose del sustrato, y en una segunda de las al menos dos posiciones de cada microespejo, la luz se refleja a lo largo del eje óptico y hacia el sustrato. El sistema óptico de proyección recibe la luz reflejada procedente de los microespejos, y forma una imagen de los microespejos, de manera precisa, sobre la superficie activa del sustrato. Se puede usar un sistema óptico de colimación para colimar la luz, procedente de la fuente, en un haz que se proporciona directamente a la matriz de microespejos o a un dispositivo divisor del haz, en el que el dispositivo divisor del haz refleja una porción del haz a la matriz de microespejos y transmite la luz reflejada procedente de la matriz de microespejos a través del dispositivo divisor del haz. La luz reflejada directamente desde los microespejos, o transmitida a través del dispositivo divisor del haz, se dirige a las lentes del sistema óptico de proyección que forma la imagen de la matriz de microespejos sobre la superficie activa del sustrato. Debido a que los microespejos se pueden orientar selectivamente, en la matriz de microespejos la luz que se les proporciona puede reflejarse completamente o desviarse completamente, la imagen de la matriz de microespejos exhibe un contraste muy alto entre lugares que tienen elementos de una imagen (píxeles) y los que no lo tienen. Los microespejos también pueden ser capaces de ser graduados en más de dos posiciones, en cuyo caso se pueden suministrar sistemas ópticos adicionales para permitir la exposición de más de un sustrato usando un único dispositivo de matriz de microespejos. Además, los microespejos son capaces de reflejar la luz de cualquier longitud de onda sin dañarlos, permitiendo una luz de longitud de onda corta, que incluye luz en el intervalo de la luz ultravioleta al ultravioleta próximo, que se va a utilizar procedente de la fuente de luz.

25 Se puede hacer operar la matriz de microespejos bajo el control de un ordenador que proporciona a la matriz de microespejos las señales apropiadas de dirección de los lugares que tienen elementos de una imagen con el fin de provocar que los microespejos apropiados estén en sus posiciones de "reflexión" o de "desvío". El patrón apropiado de la matriz de microespejos, para cada etapa de activación en cada nivel de bases que se va a añadir a las sondas, se programa en el controlador por ordenador. El controlador por ordenador controla de esa manera la secuencia de las imágenes presentadas por la matriz de microespejos en coordinación con los reactivos proporcionados al sustrato.

30 En una realización, el sustrato puede ser transparente, permitiendo que la imagen de la matriz de microespejos sea proyectada a través de la superficie del sustrato opuesta a la superficie activa. El sustrato se puede montar dentro de una celda de flujo, con un recinto que cierra herméticamente la superficie activa de la matriz, permitiendo que los reactivos apropiados fluyan a través de la celda de flujo y sobre la superficie activa de la matriz en la secuencia apropiada para que se acumulen las sondas en la matriz.

Otros objetos, características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada cuando se considere conjuntamente con los dibujos que la acompañan.

### Breve descripción de los dibujos

5

En los dibujos:

La Figura 1 es una vista esquemática de un aparato sintetizador de matrices según la presente invención.

La Figura 2 es una vista esquemática de otro aparato sintetizador de matrices según la presente invención.

10 La Figura 3 es una vista esquemática, más detallada, de un aparato sintetizador general de matrices telecéntrico según la invención.

La Figura 4 es diagrama ilustrativo de los rayos para el sistema óptico de refracción del aparato de la Figura 3.

La Figura 5 es una vista esquemática de una realización adicional de un aparato sintetizador de matrices, según la invención, en la que se utilizan sistemas ópticos telecéntricos de reflexión.

15 La Figura 6 es un diagrama ilustrativo de los rayos para el sistema óptico de reflexión del aparato de la Figura 5.

La Figura 7 es una vista en planta, desde arriba, de una celda de flujo de una cámara de reacción que se puede utilizar en el aparato sintetizador de matrices de la invención.

La Figura 8 es una vista en corte transversal a través de la celda de flujo de la cámara de reacción de la Fig. 7, tomada generalmente a lo largo de las líneas 8-8 de la Figura 7.

20 La Figura 9 es una vista ilustrativa que muestra el revestimiento de un sustrato con una molécula conectora fotolábil. La Figura 10 es una vista ilustrativa que muestra la fotodesprotección de la molécula conectora y la producción de grupos OH libres.

La Figura 11 es una vista ilustrativa que muestra el acoplamiento de los marcadores a los grupos OH libres producidos mediante la desprotección de las moléculas conectoras.

25 La Figura 12 es una vista ilustrativa que muestra el acoplamiento del DMT-nucleótido a los grupos OH libres producidos mediante la fotodesprotección de las moléculas conectoras.

La Figura 13 es una vista ilustrativa que muestra la desprotección por ácido de los DMT-nucleótidos.

La Figura 14 es una vista ilustrativa que muestra la hibridación de una sonda poli-A, marcada con fluoresceína, con un oligonucleótido poli-T sintetizado a partir de los CEP (pares de elementos conservados) de los DMT-nucleótidos.

30

### Descripción detallada de la invención

Con referencia a los dibujos, en la Figura 10 se muestra, de forma general, un aparato ejemplar que se puede usar para la síntesis de matrices de sondas de ADN, la síntesis de polipéptidos y similares, e incluye un sistema 11 formador de imagen de la matriz bidimensional y un sustrato 12 sobre el que se proyecta la imagen de la matriz por parte del sistema 11 formador de imagen. Para la configuración mostrada en la Figura 1, el sustrato tiene una superficie 14 expuesta de entrada y una superficie 15 activa opuesta sobre la que se va a fabricar una matriz bidimensional de sondas 16 de secuencias de nucleótidos. A efectos de ilustración, se muestra el sustrato 12 en la figura con un recinto 18 de la celda de flujo montado sobre el sustrato 12 que encierra un volumen 19 al que se le pueden proporcionar los reactivos a través de un puerto de entrada 20 y un puerto de salida 21. Sin embargo, el sustrato 12 se puede utilizar en el presente sistema con la superficie activa 15 del sustrato haciendo frente al sistema 11 formador de imagen y encerrado dentro de la celda de flujo de la cámara de reacción, con una ventana transparente para permitir que la luz sea proyectada sobre la superficie activa. La invención también puede usar un sustrato opaco o poroso. Los reactivos se pueden proporcionar a los puertos 20 y 21 desde un sintetizador base convencional (no mostrado en la Figura 1).

35

40

45

El sistema 11 formador de imagen incluye una fuente 25 de luz (por ejemplo, una fuente de ultravioleta o ultravioleta próximo, tal como una lámpara de arco de mercurio), un filtro 26 opcional para recibir el haz 27 de salida, procedente de la fuente 25, y que deja pasar únicamente las longitudes de onda deseadas (por ejemplo, la línea de 365 nm del Hg), y una lente 28 condensadora para formar un haz 30 colimado. También se pueden usar otros dispositivos para filtrar o monocromar la luz de la fuente, por ejemplo rejillas de difracción, espejos dicróicos, y prismas, en vez de un filtro de transmisión, y que están referidos aquí de una forma genérica como "filtros". El haz 30 se proyecta sobre un divisor 32 de haz que refleja una porción del haz 30 en un haz 33 que se proyecta sobre el dispositivo 35 de matriz bidimensional de microespejos. El dispositivo 35 de matriz de microespejos tiene una matriz bidimensional de microespejos 36 individuales que son, cada uno, sensibles a las señales de control suministradas al dispositivo 35 de matriz para inclinarse en una de al menos dos direcciones. Se proporcionan señales de control desde un controlador 38 por ordenador sobre las líneas 39 de control al dispositivo 35 de matriz de microespejos. Los microespejos 36 están contruidos de forma que en una primera posición de los espejos, la porción del haz de luz 33 entrante que choca contra un microespejo 36 individual, es reflejada en una dirección oblicua respecto al haz 33 de entrada, como se indica mediante las flechas 40. En una segunda posición de los espejos 36, la luz del haz 33 que choca contra estos espejos en esta segunda posición, es reflejada hacia atrás, paralela al haz 33, como se indica mediante las flechas 41. La luz reflejada desde cada uno de los espejos 38 constituye un haz 41 individual. Los múltiples haces 41 son incidentes sobre el divisor 32 del haz y pasan a través del divisor del haz con intensidad reducida, y son luego incidentes sobre el sistema óptico 44 de proyección compuesto, por ejemplo, por las lentes 45 y 46 y un diafragma iris 47 ajustable. El sistema óptico 44 de proyección sirve para formar una imagen del patrón de la matriz 35 de microespejos, según se representa mediante los haces 41 individuales (y las áreas oscuras entre

50

55

60

65

estos haces), sobre la superficie activa 15 del sustrato 12. Los haces 41 salientes se dirigen a lo largo del eje óptico principal del sistema 11 formador de imagen, que se extiende entre el dispositivo de microespejos y el sustrato. El sustrato 12 en la configuración mostrada en la Figura 1 es transparente, formado, por ejemplo, de vidrio de sosa y cal, o de sílice fundido, o cuarzo, de forma que la luz proyectada sobre él, representada ilustrativamente por las líneas marcadas con el número 49, pasan a través del sustrato 12 sin una difusión o atenuación sustancial.

Una matriz 35 de microespejos preferida es el Digital Micromirror Device (DMD) (Dispositivo digital de microespejos) que se puede conseguir comercialmente de Texas Instruments, Inc. Estos dispositivos tienen matrices de microespejos (cada uno de los cuales es sustancialmente cuadrado, con bordes de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud) que son capaces de formar haces de luz patrón, orientando electrónicamente los microespejos en las matrices. Estos dispositivos DMD se usan normalmente para proyecciones de video y están disponibles en diversos tamaños de matrices, por ejemplo 640  $\times$  800 elementos de microespejos (512.000 píxeles), 640  $\times$  480 (VGA; 307.200 píxeles), 800  $\times$  600 (SVGA; 480.000 píxeles); y 1024  $\times$  768 (786.432 píxeles). En los siguientes artículos y patentes se trata de estas matrices: Larry J. Hornbeck, "Digital Light Processing and MEMs: Reflecting the Digital Display Needs of the Networked Society", SPIE/EOS European Symposium on Laser, Optics, and Vision for Productivity and Manufacturing I, Besancon, Francia, Junio 10-14, 1996; y las Patentes de EE.UU. 5.096.279, 5.535.047, 5.583.688 y 5.600.383. Los microespejos 36 de estos dispositivos son capaces de reflejar la luz de longitudes de onda utilizables normales, que incluyen la luz ultravioleta y la luz ultravioleta próxima, de una manera eficaz, sin dañar los propios espejos. La ventana del recinto para la matriz de microespejos tiene, preferiblemente, revestimientos anti-reflectantes sobre ella, optimizados para las longitudes de onda de luz que se usa. Utilizar matrices de 600  $\times$  800 de microespejos, que se pueden conseguir comercialmente, que codifican 480.000 píxeles, con dimensiones típicas del dispositivo de microespejos de 16 micrómetros por lado de espejo y una altura en la matriz de 17 micrómetros, proporciona unas dimensiones totales de la matriz de microespejos de 13.600 micrómetros por 10.200 micrómetros. Usando un factor de reducción de 5 a través del sistema óptico 44, un valor típico y que se puede conseguir fácilmente para una lente litográfica, las dimensiones de la imagen proyectada sobre el sustrato 12 son, por eso, de aproximadamente 2.220 micrómetros por 2.040 micrómetros, con una resolución de aproximadamente 2 micrómetros. Se pueden exponer imágenes más grandes sobre el sustrato 12 utilizando múltiples exposiciones juntas (bien por cada acción sucesiva de la celda 18 de flujo o del proyector 11 de imagen), o usando una matriz de microespejos más grande. También es posible hacer una formación de imagen, una a una, sin reducción, así como un agrandamiento de la imagen sobre el sustrato, si se desea.

El sistema óptico 44 de proyección puede ser de diseño estándar, ya que las imágenes que se van a formar son relativamente grandes y bien alejadas del límite de difracción. Las lentes 45 y 46 enfocan la luz en el haz 41 que pasa a través del diafragma iris 47 ajustable, hacia la superficie activa del sustrato. El sistema óptico 44 de proyección y el divisor 32 de haz están dispuestos de forma que la luz desviada por la matriz de microespejos fuera del eje óptico principal (el eje central del sistema óptico 44 de proyección respecto al cual son paralelos los haces 41), ilustrado por los haces marcados por el número 40 (por ejemplo,  $10^\circ$  fuera del eje) cae fuera de la pupila de entrada del sistema óptico 44 de proyección (típicamente  $0,5/5 = 0,1$ ;  $10^\circ$  corresponde a una abertura de 0,17, sustancialmente superior a 0,1). El diafragma iris 47 se usa para controlar la abertura numérica eficaz y para asegurar que la luz no deseada (en particular los haces 40 fuera del eje) no se transmitan al sustrato. Con estos sistemas ópticos se pueden obtener resoluciones de las dimensiones tan pequeñas como de 0,5 micrómetros. Para aplicaciones de fabricación, se prefiere que la matriz 35 de microespejos esté situada en el plano focal objeto de una lente litográfica con línea l optimizada a 365 nm. Estas lentes operan, habitualmente, con una abertura numérica (NA) de 0,4 a 0,5, y tienen una gran capacidad de campo.

El dispositivo 35 de matriz de microespejos se puede formar con una única línea de microespejos (por ejemplo, con 2.000 elementos de espejos en una línea) que se mueve gradualmente en un sistema de barrido. De esta manera, la altura de la imagen está fijada por la longitud de la línea de la matriz de microespejos, pero la anchura de la imagen que se puede proyectar sobre el sustrato 12 está esencialmente ilimitada. Moviendo el recinto 18 que lleva el sustrato 12, los espejos pueden repetir en cada posición indexada del sustrato con el fin de definir el patrón de imagen en cada nueva línea que se forma sobre la superficie activa del sustrato.

Se pueden utilizar diversas aproximaciones en la fabricación de las sondas 16 de ADN sobre el sustrato 12, y son adaptaciones de las técnicas microlitográficas. En una "aproximación de fotofabricación directa", el sustrato 12 de vidrio está revestido con una capa de un producto químico capaz de unirse a las bases nucleótidas. La luz se aplica mediante el sistema 11 de proyección, desprotegiendo los grupos OH del sustrato, dejándolos dispuestos para unirse a las bases. Después del revelado, se hace fluir la base nucleótida apropiada sobre la superficie activa del sustrato y se une a los lugares seleccionados usando la química de síntesis del ADN con fosforamidita. Se repite luego el procedimiento, uniendo otra base a un conjunto diferentes de lugares. El procedimiento es simple, y si se usa una aproximación combinatoria, el número de permutaciones aumenta exponencialmente. El límite de resolución se presenta mediante la respuesta lineal del mecanismo de desprotección. Debido a las limitaciones en la resolución que se puede conseguir con este método, se pueden usar en su lugar métodos basados en la tecnología de las sustancias fotoprotectoras, como en el documento de McGall y colaboradores, citado anteriormente. En la aproximación de la fotofabricación indirecta, existen químicas compatibles con un sistema protector en dos capas, donde una primera capa de, por ejemplo, poliimida actúa como protección para la química subyacente, mientras que

la capa protectora superior de la formación de imágenes es un sistema de base epoxídica. La etapa de formación de imagen es común a ambos procesos, siendo el principal requisito que la longitud de onda de la luz usada en el proceso de formación de imagen sea suficientemente larga para no excitar las transiciones (cambios químicos) en las bases nucleótidas (que son particularmente sensibles a 280 nm). Por lo tanto, se usarán longitudes de onda más largas de 300 nm. 365 nm es la línea I del mercurio, que es la usada más comúnmente en la litografía con láminas semiconductoras.

Otra forma del aparato sintetizador 10 de matrices se muestra en una vista esquemática simplificada de la Figura 2. En esta disposición no se usa el divisor 32 de haz, y la fuente 25 de luz, el filtro opcional 26, y la lente condensadora 28 se montan en un ángulo respecto a el eje óptico principal (por ejemplo, a 20° respecto al eje) para proteger el haz de luz 30 sobre la matriz de microespejos 36 en un ángulo. Los microespejos 36 se orientan para reflejar la luz 30 hacia fuera de los haces axiales 40 en una primera posición de los espejos, y en los haces 41 a lo largo del eje principal en una segunda posición de cada espejo. Por lo demás, el sintetizador de matrices de la Figura 2 es el mismo que el de la Figura 1.

En la Figura 3 se muestra una vista más detallada de un aparato sintetizador de matrices preferido que usa la disposición de proyección fuera del eje, de la Figura 2. En el aparato de la Figura 3, la fuente 25 (por ejemplo una lámpara de arco de Hg de 1.000 W, Oriel 6287, 66021), alimentada desde una fuente de energía 50 (por ejemplo, Oriel 68820), se usa como fuente de luz que contiene las longitudes de onda del ultravioleta deseadas. El sistema de filtro 26 está compuesto, por ejemplo, de un espejo dicróico (por ejemplo, Oriel 66226) que se usa para absorber la luz infrarroja y reflejar selectivamente luz de longitudes de onda que van desde los 280 a los 400 nm. Se usa un filtro líquido enfriado por agua (por ejemplo, Oriel 6127) lleno de agua desionizada para absorber cualquier radiación infrarroja remanente. Se usa un filtro de vidrio coloreado (Oriel 59810) o un filtro de interferencias (Oriel 56531) para seleccionar la línea de 365 nm de la lámpara 25 de Hg con un 50% de anchura de banda de 50 nm o de 10 nm, respectivamente. Se usa un condensador F/1 de sílice fundida de dos elementos (Oriel 66024) como el condensador 28, y con dos lentes 52 plano-convexas (Melles Griot 01LQP033 y Melles Griot 01LQP023), forman un sistema de iluminación Kohler. Este sistema de iluminación produce un haz uniforme 30, más o menos colimado, de luz de 365 nm, con un diámetro suficientemente grande para abarcar el área activa de 16 mm × 12 mm del dispositivo 35 de matriz de microespejos. Este haz 30 es incidente sobre el dispositivo 35 con un ángulo de 20° medido desde la normal a la cara del dispositivo. El dispositivo de matriz de microespejos está situado aproximadamente a 700 mm fuera del último filtro. Cuando los microespejos están en la primera posición, la luz en el haz 30 es desviada hacia abajo y fuera del sistema. Por ejemplo, en este dispositivo de microespejos, los espejos en su primera posición pueden estar en un ángulo de -10° con respecto a la normal al plano de los microespejos para reflejar la luz bien alejada del eje óptico. Cuando se controla un microespejo para que se desvíe a una segunda posición, por ejemplo a un ángulo de +10° con respecto a la normal al plano de los microespejos, la luz reflejada desde estos espejos en la segunda posición emerge perpendicularmente al plano de la matriz de microespejos, en el haz 41. El patrón formado por la luz reflejada desde los microespejos en su segunda posición, forma luego una imagen sobre la superficie activa 15 de un sustrato 12 de vidrio encerrado en una celda 18 de flujo usando un sistema telecéntrico de formación de imagen, compuesto de dos lentes dobles 45 y 46 y una abertura 47 ajustable. Cada una de las lentes dobles 45 y 46 están compuestas de un par de lentes plano-convexas (por ejemplo, Melles Griot 01LQP033 y 01LQP037) puestas juntas con las superficies curvadas casi tocándose. La primera lente doble está orientada de forma que el lado (01LQP033) de la longitud focal más corta está hacia el dispositivo 35 de matriz de microespejos, y la segunda lente doble está orientada de forma que su lado (01LQP037) de longitud focal más larga está hacia el dispositivo 35 de matriz de microespejos. Se pueden usar lentes dobles compuestas de lentes idénticas, en cuyo caso cada lado puede estar frente a frente con el dispositivo de matriz de microespejos. La abertura 47 ajustable, también llamada abertura telecéntrica, está situada en el plano focal posterior de la primera lente doble. Se usa para variar la recepción angular del sistema óptico. Los diámetros de abertura más pequeños corresponden a un mejor contraste y resolución, pero con la correspondiente disminución de la intensidad en la imagen. Como se ilustra en la Figura 3, se puede conectar un sintetizador 55 estándar de ADN, provisto de los productos químicos necesarios, mediante los tubos 20 y 21 a la celda 18 de flujo para proporcionar la secuencia deseada de productos químicos, bien bajo control independiente o bajo el control por ordenador 38. Un diámetro típico para la abertura 47 es aproximadamente 30 nm. En la Figura 4 se muestra un diagrama ilustrativo de rayos que muestra los recorridos de la luz a través de las lentes 45 y 46 para este tipo de sistema óptico de refracción. Se muestran haces de rayos que se originan en el centro del objeto (la cara del dispositivo de microespejos), en el borde, y en una posición intermedia. El sistema óptico forma una imagen invertida de la cara del dispositivo de matriz de microespejos.

En la Figura 5 se muestra otra realización del aparato sintetizador de matrices, que usa un sistema óptico de reflexión. Un sistema que sirve de ejemplo utiliza una lámpara de arco, de Hg, de 1000 W como una fuente de luz (por ejemplo, Oriel 6287, 66021), con un sistema de filtro formado por un espejo dicróico (por ejemplo Oriel 66228) que absorbe la luz infrarroja y refleja selectivamente luz de longitudes de onda que van desde 350 a 450 nm. Se usa un condensador F/1 de sílice fundida de dos elementos (Oriel 66024) para producir un haz 30 de luz, más o menos colimado, que contiene la línea de 365 nm, pero que excluye las longitudes de onda no deseables de alrededor de, y por debajo de, 300 nm. Se puede usar también, opcionalmente, un sistema de iluminación Kohler en el aparato de la Figura 5 para aumentar la uniformidad y la intensidad. El haz 30 es incidente sobre el dispositivo 35 de matriz de microespejos que tiene un área activa de microespejos de aproximadamente 16 mm × 12 mm y que está situado a aproximadamente 210 nm de la embocadura de la fuente 25 de radiación UV, chocando el haz 30 sobre la cara

plana del dispositivo 35 de microespejos con un ángulo de  $20^\circ$  con respecto a una normal al plano de la matriz. La luz reflejada desde los microespejos, en una primera posición de los microespejos, por ejemplo  $-10^\circ$  con respecto al plano de la matriz, se dirige fuera del sistema, mientras que la luz procedente de los espejos que están en la segunda posición, por ejemplo  $+10^\circ$  con respecto al plano de la matriz, se dirige en el haz 41 hacia un sistema telecéntrico reflectante, formador de imagen, compuesto de un espejo cóncavo 60 y un espejo convexo 61. Ambos espejos son, preferiblemente, esféricos y tienen un mejor revestimiento en lo que respecta al UV para dar una alta reflectividad. Después de efectuar las reflexiones desde los espejos 60 y 61, el haz 41 puede ser incidente sobre otro espejo plano 63 que desvía el haz hacia la celda 18 de flujo. La luz reflejada desde los microespejos se transforma en imagen sobre la superficie activa de un sustrato de vidrio encerrada en la celda 18 de flujo. Se puede poner una abertura telecéntrica (no mostrada en la Figura 5) en frente del espejo convexo. El haz 41 choca primero con el espejo cóncavo, luego con el espejo convexo, y luego de nuevo con el espejo cóncavo, con el espejo plano 63 que se usa, opcionalmente, para desviar la luz  $90^\circ$  para dirigirlo a la celda 18 de flujo. Para el sistema mostrado, el espejo cóncavo 60 puede tener un diámetro de 152,4 mm, y un radio de la superficie del espejo esférico de 304,8 mm (ES F493561), y el espejo convexo puede tener un diámetro de 25 mm, y un radio de la superficie del espejo esférico de 152,94 (Es F45625). Idealmente, el radio de curvatura del espejo cóncavo es dos veces el del espejo convexo. Estos sistemas ópticos de reflexión son bien conocidos y se usan de forma convencional en la litografía óptica en sistemas tipo "MicroAlign". Véase, por ejemplo, "New Concepts in Projection Mask Aligners", de A. Offner, Optical Engineering, Volumen 14, páginas 130-132 (1975), y "Excimer Laser Projection Lithography on a Full-Field Scanning Projection System" de R.T. Kerth y colaboradores, IEEE Electron Device Letters, Volumen EDL-7(5), páginas 299-301 (1986).

La Figura 6 ilustra la formación de una imagen para el sistema óptico de la Figura 5. En la Figura 6 se muestran haces de rayos que se originan en el centro del objeto (el dispositivo de matriz de microespejos), en el borde, y en una posición intermedia. Los rayos se reflejan primero desde el espejo cóncavo 60, luego desde el espejo convexo 61, luego de nuevo desde el espejo cóncavo, para formar una imagen invertida de la cara del dispositivo de matriz de microespejos. El espejo plano 63 no está incluido en el diagrama de la Figura 6. Se puede poner una abertura telecéntrica (no mostrada) en frente del espejo convexo.

Los sistemas ópticos de reflexión o de refracción son, ambos, preferiblemente "simétricos" para minimizar aberraciones tales como la aberración esférica y de coma mediante cancelación. El anterior sistema de reflexión tiene una apertura numérica más alta que produce una intensidad más alta. Los dos sistemas ópticos telecéntricos de las Figuras 3 y 5 son sistemas de formación de imagen 1:1. Un sistema de reflexión tiene las potenciales ventajas de eliminar la aberración cromática y proporcionar una resolución más alta, así como ser compacto y menos caro. Un sistema preferido para realizar una formación de imagen 1:1 será un sistema del tipo Wynne-Dyson que combina un espejo cóncavo con lentes y prismas. Tiene una apertura numérica muy alta que aumenta la intensidad. Véase, por ejemplo, "Excimer Laser Photolithography with 1:1 Wynne-Dyson Optics" de F.N. Goodall y colaboradores, SPIE Volumen 922, Optical/Laser Microlithography, 1988; y "Broadband Deep-UV High NA Photolithography System", SPIE Volumen 1088, Optical/Laser Microlithography II (1989).

En las Figuras 7 y 8 se muestran vistas más detalladas de una celda 18 de flujo de una cámara de reacción que se puede utilizar con el aparato de la invención. La celda 18 de flujo, puesta como ejemplo en estas figuras, incluye una carcasa 70 de aluminio, mantenida unida mediante pernos 71, que tiene un tubo 73 de entrada conectado a un conducto que actúa como puerto de entrada y un tubo 75 de salida convertido en un conducto 21 que actúa como puerto de salida. Como se ilustra en la vista en corte transversal de la Figura 8, la carcasa 70 incluye una base inferior 78 y una sección de cubierta superior 79 que se aseguran juntas, sobre el sustrato, con los pernos 71. El sustrato 12, por ejemplo una platina de vidrio transparente, se mantiene entre la placa superior 79 y una junta estanca 81 cilíndrica (por ejemplo, formada de Kal Rez™), que a su vez está soportada sobre un bloque base 82 no reactivo (por ejemplo, Teflon™), con un canal 85 de entrada que se extiende desde el tubo 73 de entrada hasta una cámara 88 de reacción cerrada herméticamente, formada entre el sustrato 12 y el bloque base 82 que está cerrado herméticamente por la junta estanca, y con un canal 89 de salida que se extiende desde la cámara 88 de reacción hasta el tubo 75 de salida. Los pernos 71 se pueden roscar para asegurar, de forma que se pueda desmontar, el sustrato 12 entre la sección de cubierta y la base, con el fin de permitir que el sustrato sea reemplazado con el mínimo desplazamiento de la base de la celda de flujo. Preferiblemente, como se muestra en la Figura 8, se monta una junta estanca 90 de caucho en el fondo de la placa 79 para que se ajuste al sustrato en una región periférica, con el fin de aplicar presión al sustrato contra la junta estanca 81. Si se desea, la celda de flujo se puede usar también como cámara de hibridación durante la lectura de salida.

En lo referente a los diagramas esquemáticos de las Figuras 9-14 se ilustra un procedimiento que sirve de ejemplo para formar sondas de ADN. La Figura 9 ilustra el revestimiento del sustrato 12, que tiene una capa 95 de silano que forma su superficie activa 15, con la molécula conectora fotolábil MENPOC-HEG aplicada sobre la capa de silano haciendo uso de la química de la estándar de la fosforamidita. MENPOC-HEG-CEP = 18-O-[(R,S)-(1-(3,4-(metilendioxo)-6-nitrofenil)epoxi)carbonil]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaoctadec-1-il-O'-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita. La capa de silano se hizo a partir de N-(3-(trietoxisilil)-propil)-4-hidroxitiramida. En la etapa mostrada en la Figura 9, el sustrato puede estar expuesto a la luz y los grupos OH libres activos estarán expuestos en áreas que hayan estado expuestas a la luz.

5 La Figura 10 ilustra la fotodesprotección de la molécula conectora MENPOC-HEG y la producción de grupos OH libres en el área 100 que está expuesta a la luz. La Figura 11 ilustra el acoplamiento de fluoresceína-amidita FluorePrime™ a los grupos OH libres producidos a partir de la fotodesprotección de la MENPOC-HEG. La Figura 12 ilustra el acoplamiento del DMT-nucleótido a los grupos OH libres producidos a partir de la fotodesprotección de la molécula conectora MENPOC-HEG. La Figura 13 ilustra la etapa de la desprotección ácida de los DMT-nucleótidos en el área 100 expuesta a la luz. La Figura 14 ilustra la hibridación de la sonda poli-A, marcada con fluoresceína, con oligonucleótidos poli-T sintetizado a partir de los CEP de los DMT-nucleótidos.

10 Se entiende que la invención no está confinada a las realizaciones concretas aquí expuestas como ilustración, sino que abarca todas estas formas modificadas de ellas en la medida que entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un aparato, para uso en la síntesis de matrices de sondas de ADN, polipéptidos y similares, que comprende:

- 5 (a) un sustrato (12) con una superficie activa (15) sobre la que se pueden formar matrices (16);  
 (b) una celda (18) de flujo que incluye la superficie activa del sustrato y que tiene un orificio de entrada y un orificio de salida (20, 21) para aplicar reactivos a la celda de flujo;  
 (c) un formador (11) de imagen para proyectar una imagen luminosa bidimensional, de alta precisión, sobre la superficie activa del sustrato, que comprende:

- 10 (1) una fuente (25) de luz para proporcionar un haz (27) de luz; y  
 (2) un dispositivo (35) de microespejos para recibir el haz de luz de la fuente, estando el dispositivo de microespejos formado por una matriz de microespejos (36) electrónicamente orientables, cada uno de los cuales puede inclinarse selectivamente entre una de al menos dos posiciones separadas, en el que en una de las posiciones de cada microespejo, la luz (33) de la fuente de luz incidente sobre el microespejo se desvía del eje óptico (40) y en una segunda de las al menos dos posiciones del microespejo, la luz de la fuente de luz se refleja a lo largo del eje óptico (41);  
 15 caracterizado por que el formador de imágenes comprende:  
 (3) un sistema óptico de proyección (60, 61, 63) para recibir la luz reflejada de los microespejos a lo largo del eje óptico y que forma la imagen del patrón de los microespejos sobre la superficie activa del sustrato, en el que el sistema óptico de proyección incluye dos lentes dobles de focalización y una apertura ajustable (47), la primera lente doble configurada para dejar pasar luz a través de la apertura ajustable localizada en el plano focal posterior de la primera lente doble y la segunda lente doble configurada para recibir la luz que pasa a través de la apertura y para focalizar esa luz sobre la superficie activa del sustrato.

25 2. El aparato de la reivindicación 1 en el que el dispositivo de microespejos está formado por una matriz bidimensional de microespejos.

30 3. El aparato de la reivindicación 1 que incluye una lente para colimar el haz de luz de la fuente de luz para proporcionar un haz colimado proyectado sobre la matriz de microespejos en un ángulo oblicuo respecto a un eje óptico principal que se extiende de la matriz de microespejos al sustrato, en el que el aparato incluye opcionalmente un divisor de haz situado entre la matriz de microespejos y el sistema óptico de proyección y configurado para recibir el haz de luz colimado de la fuente de luz, el divisor de haz configurado para reflejar una parte del haz de luz colimado a la matriz de microespejos y para recibir luz reflejada de la matriz de microespejos a lo largo de un eje óptico principal del aparato que se extiende de la matriz de microespejos a través del sistema óptico de proyección al sustrato, el divisor de haz configurado además para dejar pasar una parte de la luz reflejada del microespejo a través del mismo al sistema óptico de proyección para que se forme la imagen sobre la superficie activa del sustrato.

40 4. El aparato de la reivindicación 1 que incluye además un filtro para recibir la luz de la fuente de luz y para dejar pasar selectivamente únicamente longitudes de onda deseadas hasta la matriz de microespejos.

45 5. El aparato de la reivindicación 1 en el que el sustrato es transparente y la luz del formador de imagen puede pasar a través del sustrato transparente para formar la imagen sobre la superficie activa del sustrato que está en frente de la superficie que recibe inicialmente la luz del formador de imagen.

50 6. El aparato de la reivindicación 1 que incluye además un ordenador conectado al dispositivo de microespejos para proporcionar señales de control para controlar la desviación de los espejos en la matriz de microespejos para proporcionar un patrón deseado para proyección sobre el sustrato.

7. El aparato de la reivindicación 1 en el que la fuente de luz está configurada para proporcionar luz en el intervalo de longitudes de onda de ultravioleta a ultravioleta cercano.

55 8. El aparato de la reivindicación 7 que incluye un filtro para recibir la luz de la fuente de luz y para dejar pasar selectivamente longitudes de onda en el ultravioleta y el ultravioleta cercano y bloquear longitudes de onda más largas incluyendo el infrarrojo, y opcionalmente en el que el filtro (26) incluye un espejo dicróico para reflejar las longitudes de onda seleccionadas y dejar pasar las longitudes de onda para bloquear.

60 9. El aparato de la reivindicación 1 en el que el sistema óptico de proyección se configura de modo que el patrón de los microespejos para formar una imagen sobre la superficie activa del sustrato se reduce en tamaño con respecto al tamaño de la matriz de microespejos.

65 10. El aparato de la reivindicación 1 que incluye lentes de refracción entre la fuente de luz y el dispositivo de microespejos que forman un sistema de iluminación Kohler.

11. El aparato de la reivindicación 1 que incluye un sintetizador de ADN conectado para suministrar reactivos a la celda de flujo.

5 12. El aparato de la reivindicación 1 en el que la celda de flujo tiene una carcasa que comprende una base inferior, una sección de cubierta superior y una junta montada sobre la base, en el que el sustrato es una platina de vidrio transparente fijada entre la sección de cubierta superior y la base inferior para definir una cámara de reacción que se precinta mediante la junta, y canales que se extienden a través de la carcasa desde el orificio de entrada a la cámara de reacción y desde la cámara de reacción al orificio de salida, estando la superficie activa del sustrato  
10 en el que opcionalmente el aparato incluye medios para fijar de forma desmontable el sustrato entre la base inferior y la sección de cubierta superior para permitir que el sustrato se reemplace.

13. El aparato de la reivindicación 1 en el que la superficie activa del sustrato está frente al formador de imagen y además en el que la celda de flujo comprende una ventana transparente a través de la cual puede proyectarse luz  
15 del formador de imagen sobre la superficie activa del sustrato.

14. El aparato de la reivindicación 1, en el que el sustrato con la superficie activa comprende un sustrato recubierto con una capa de un producto químico capaz de unirse con bases nucleotídicas mediante química de síntesis de  
20 ADN de fosforamidita.

15. El aparato de la reivindicación 14, en el que:  
el sustrato con una superficie activa es un sustrato de vidrio recubierto con una capa de silano; y/o  
el sistema óptico de proyección es capaz de proporcionar una resolución tan pequeña como de 0,5 micrómetros.

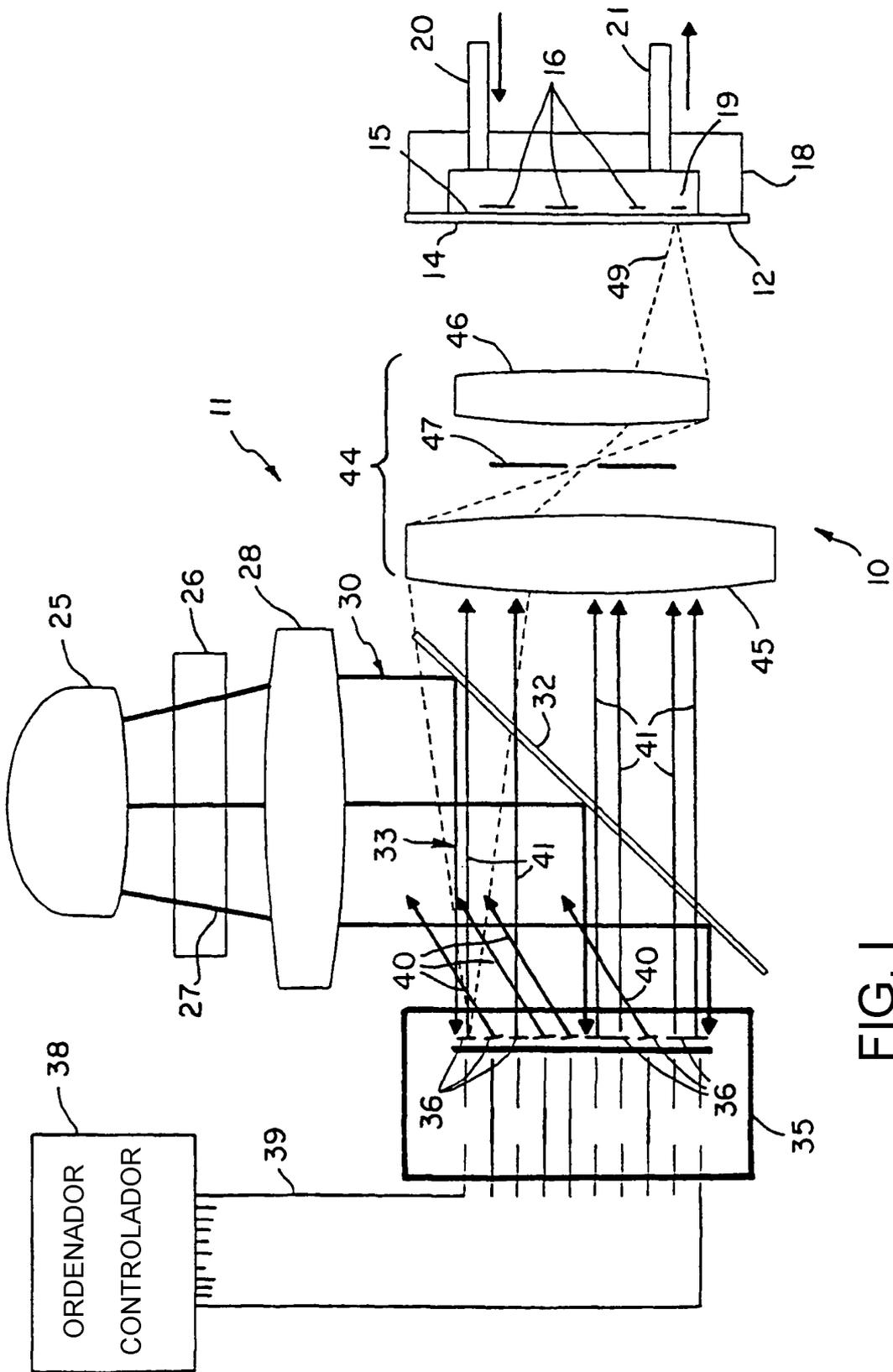


FIG. 1



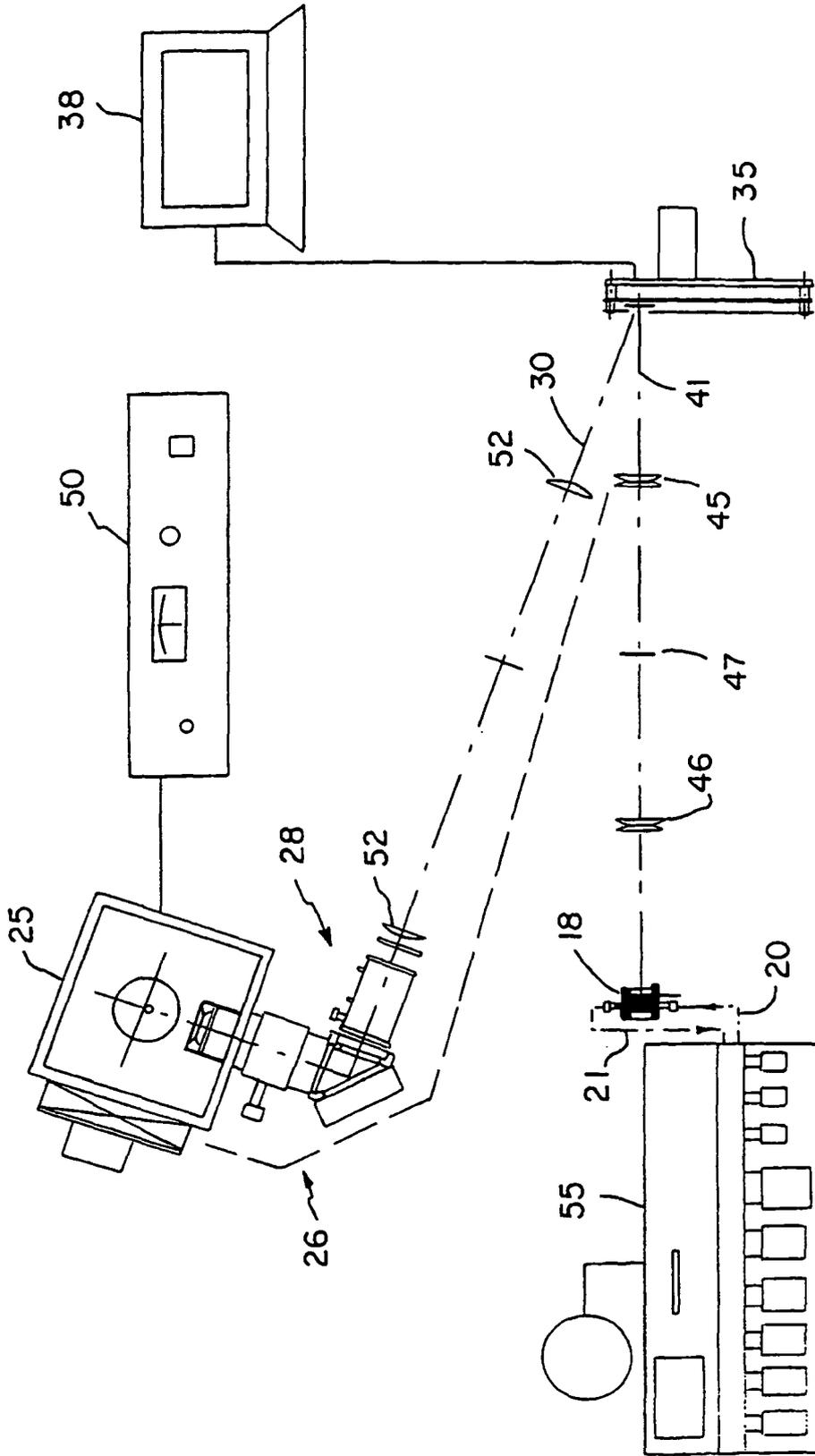


FIG. 3

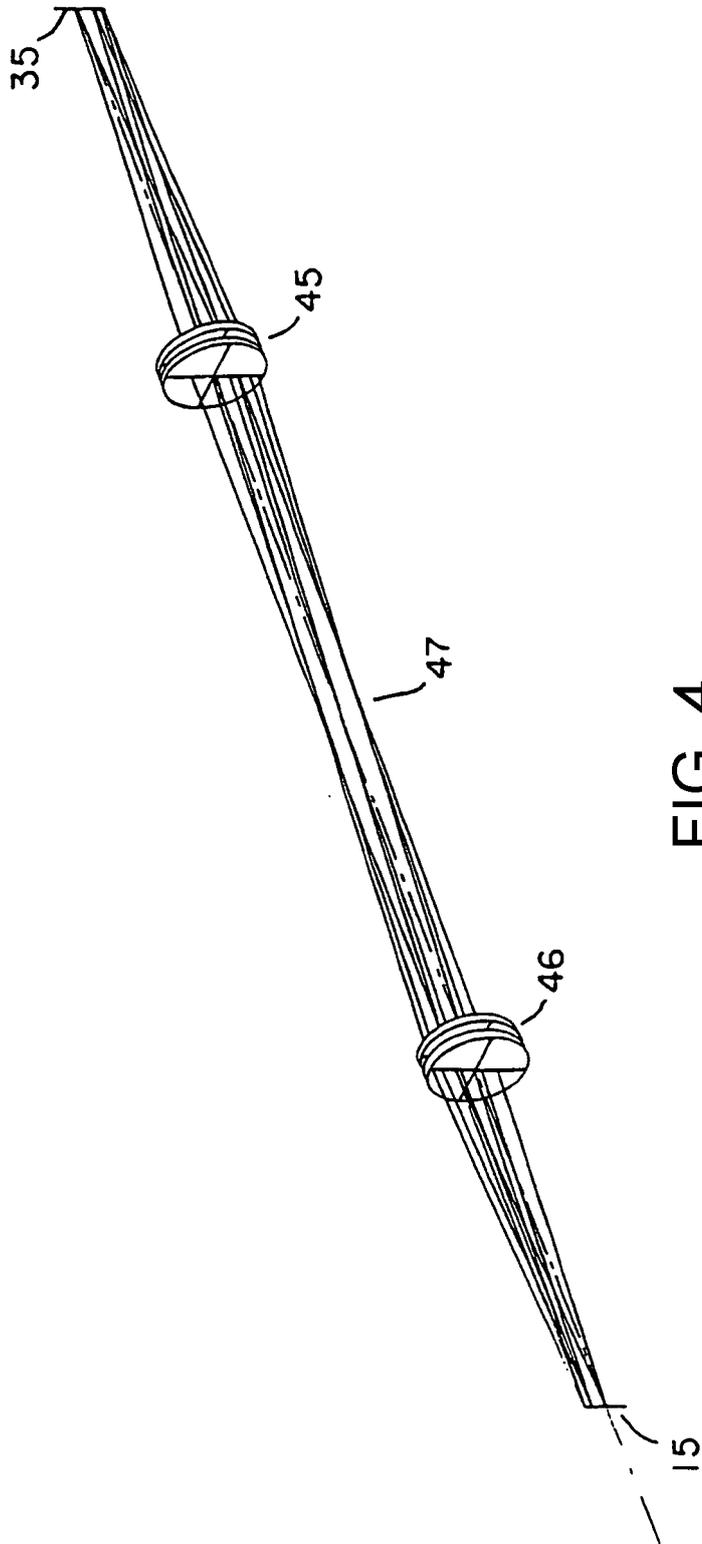


FIG. 4

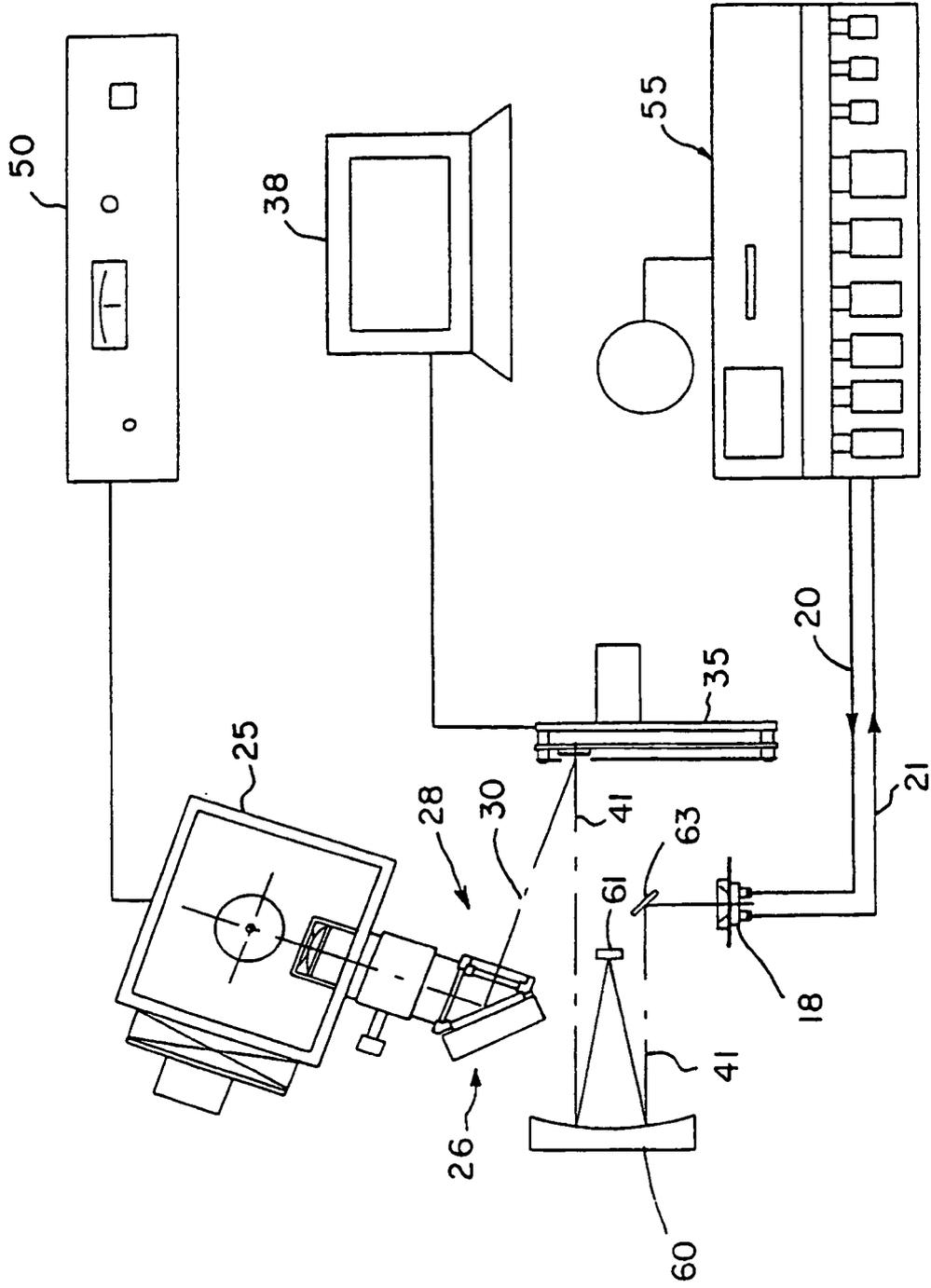


FIG. 5

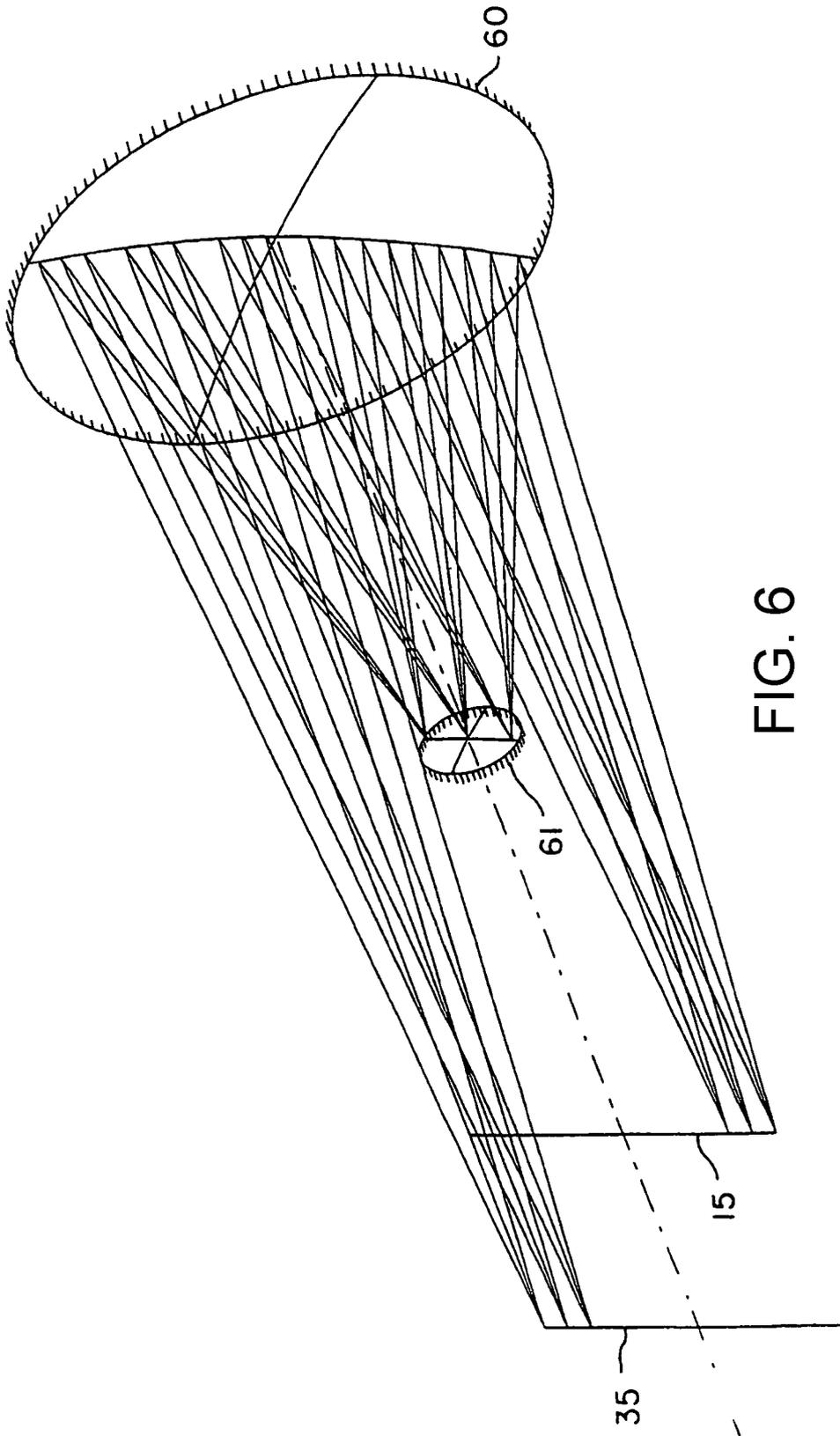


FIG. 6

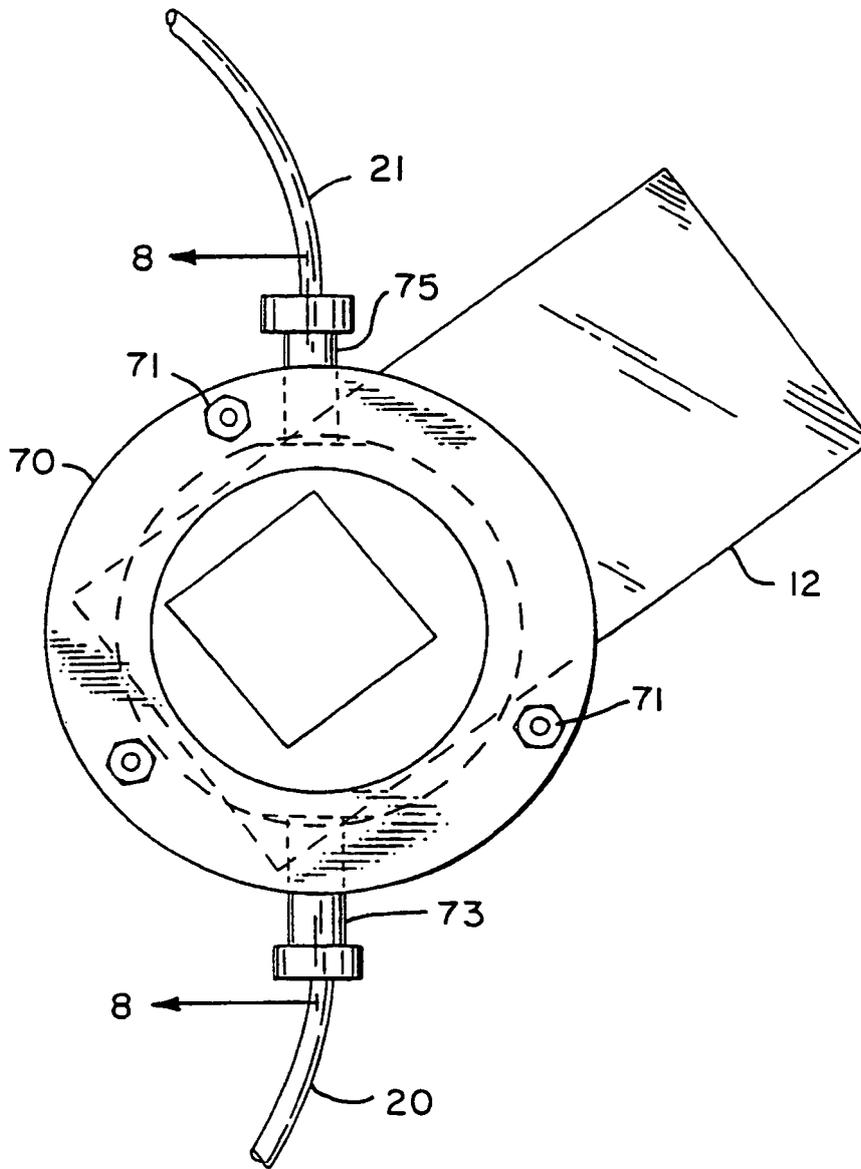


FIG. 7

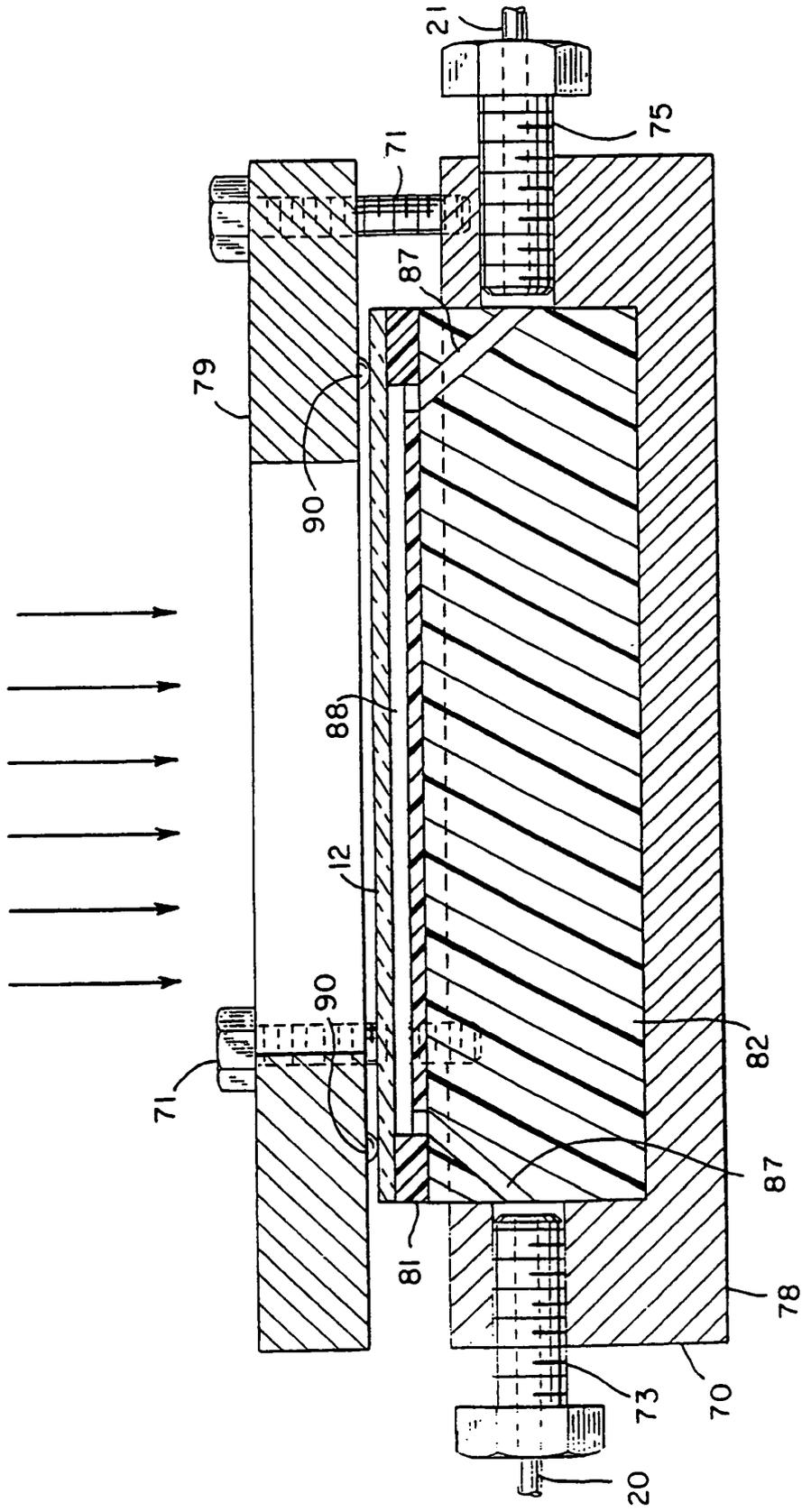


FIG. 8

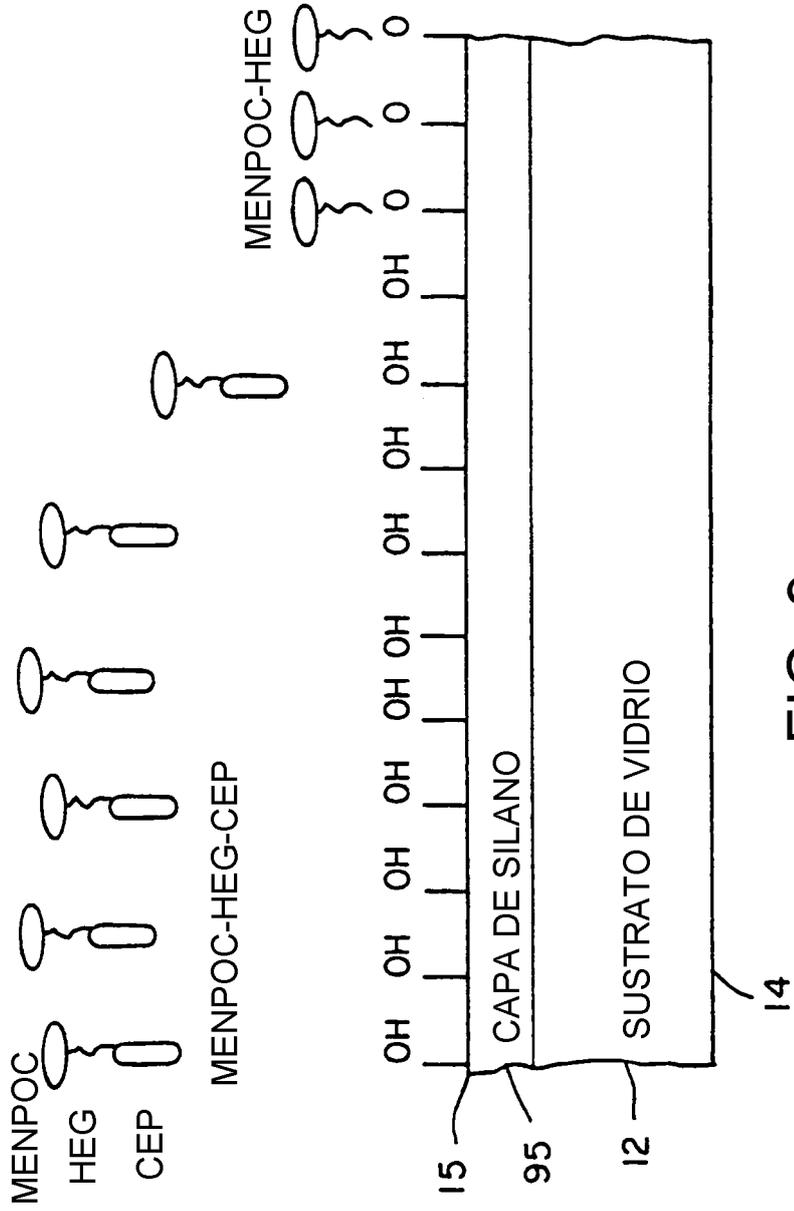


FIG. 9

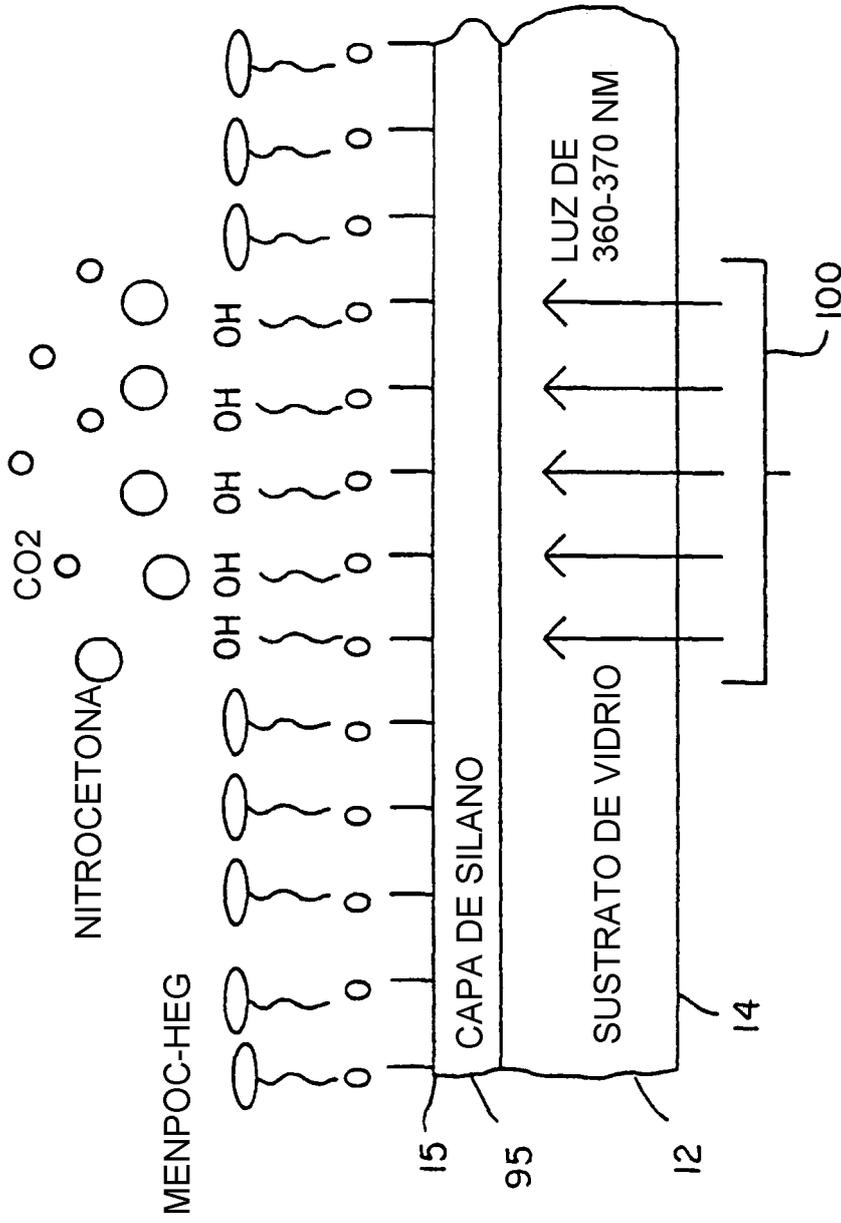


FIG. 10

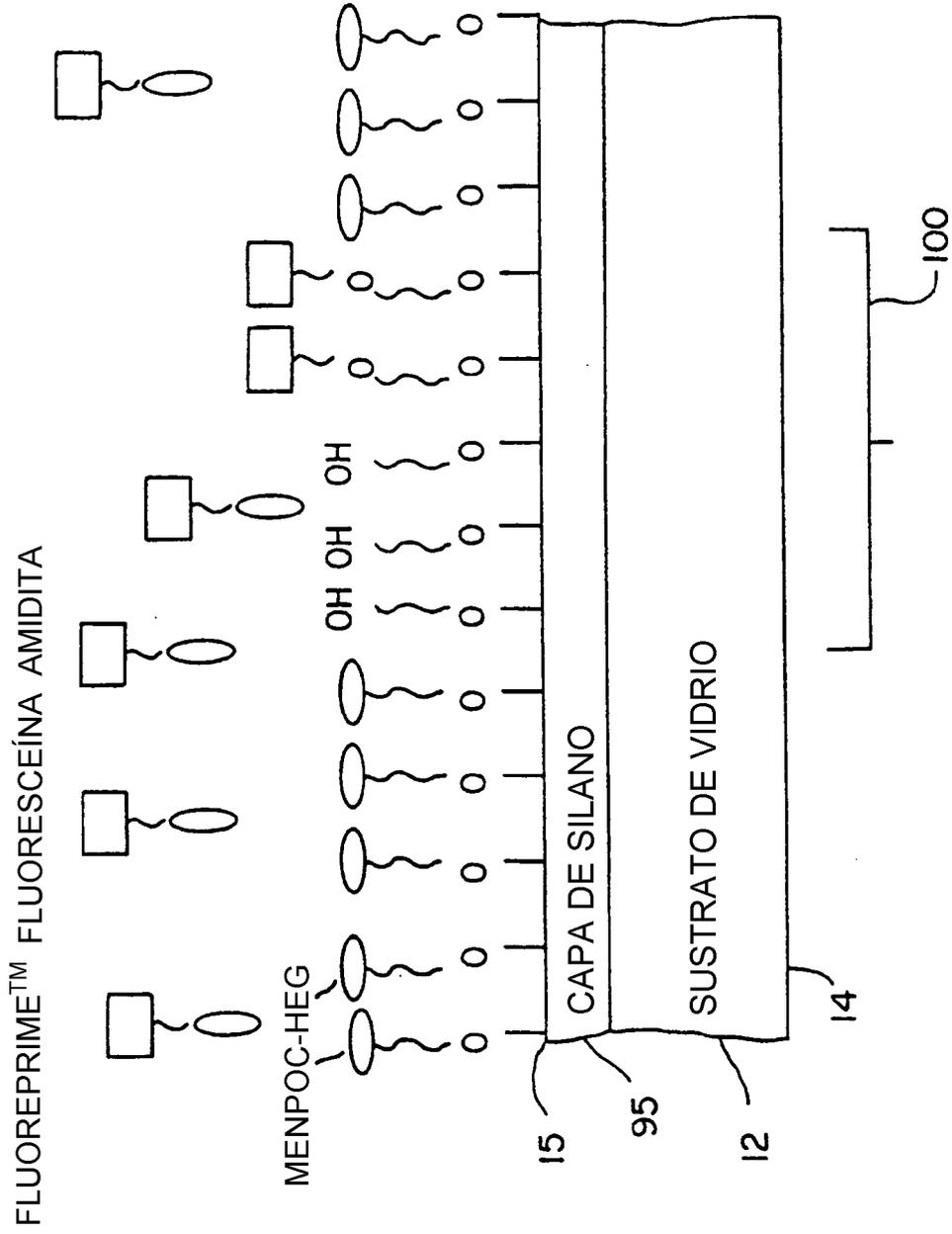


FIG. II

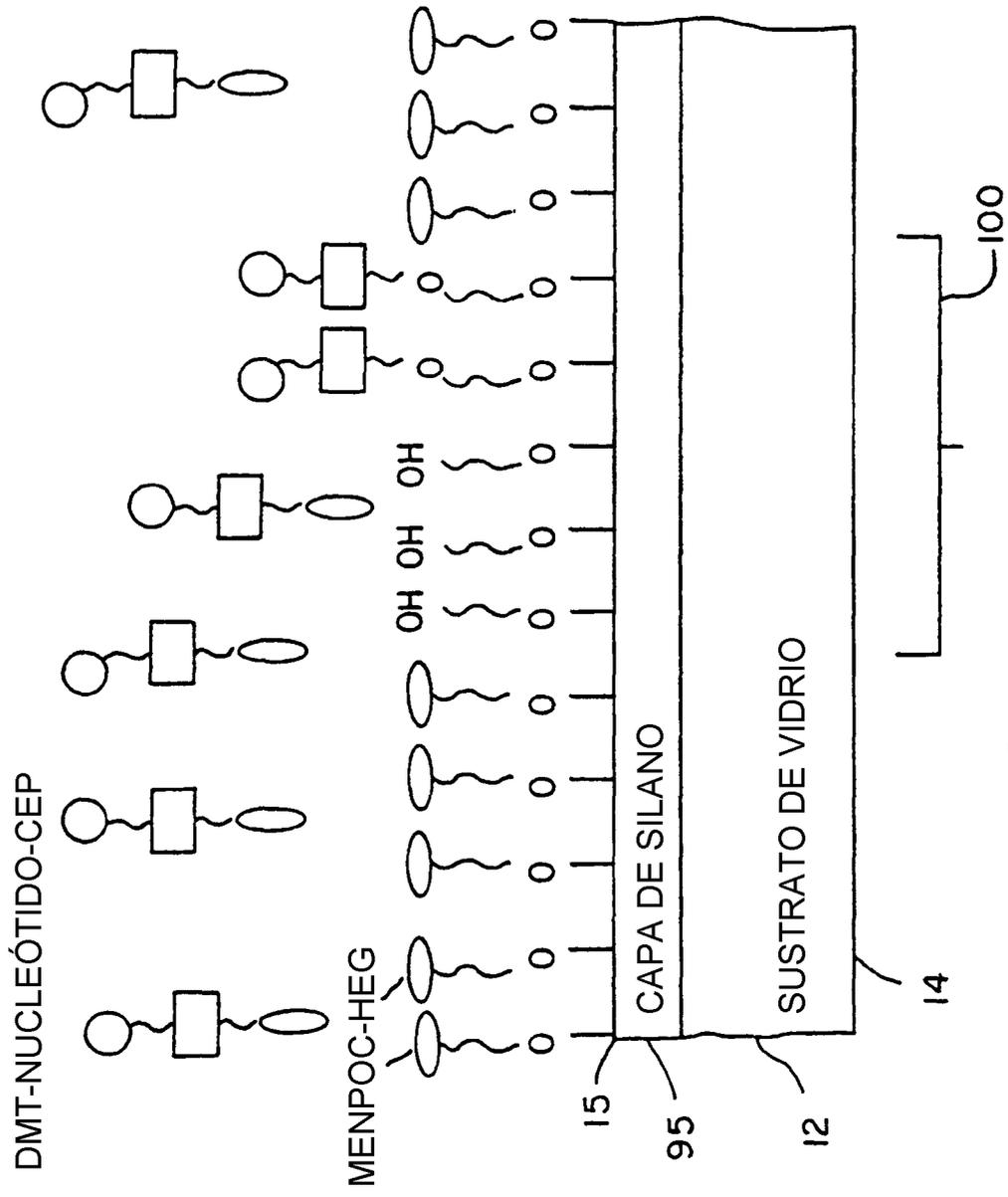


FIG. 12

SOLUCIÓN ÁCIDA

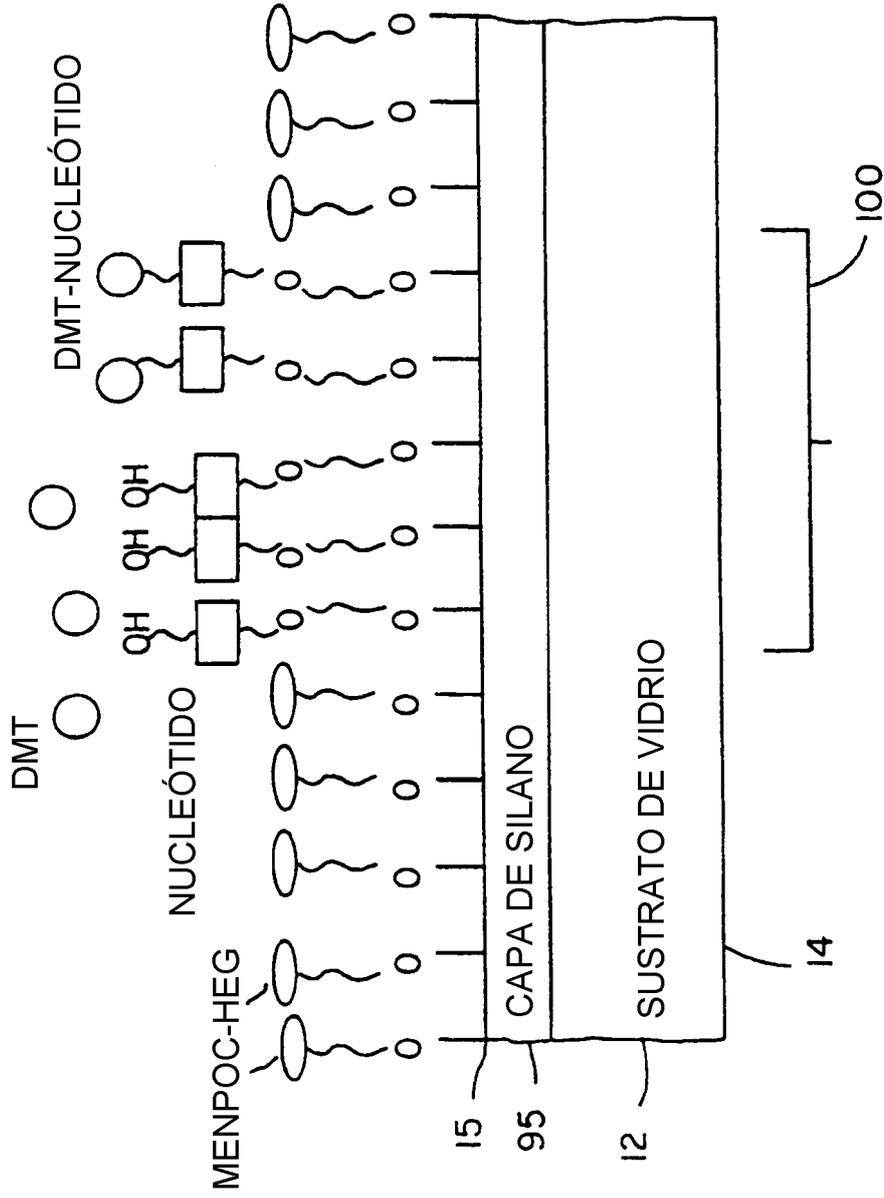


FIG. 13

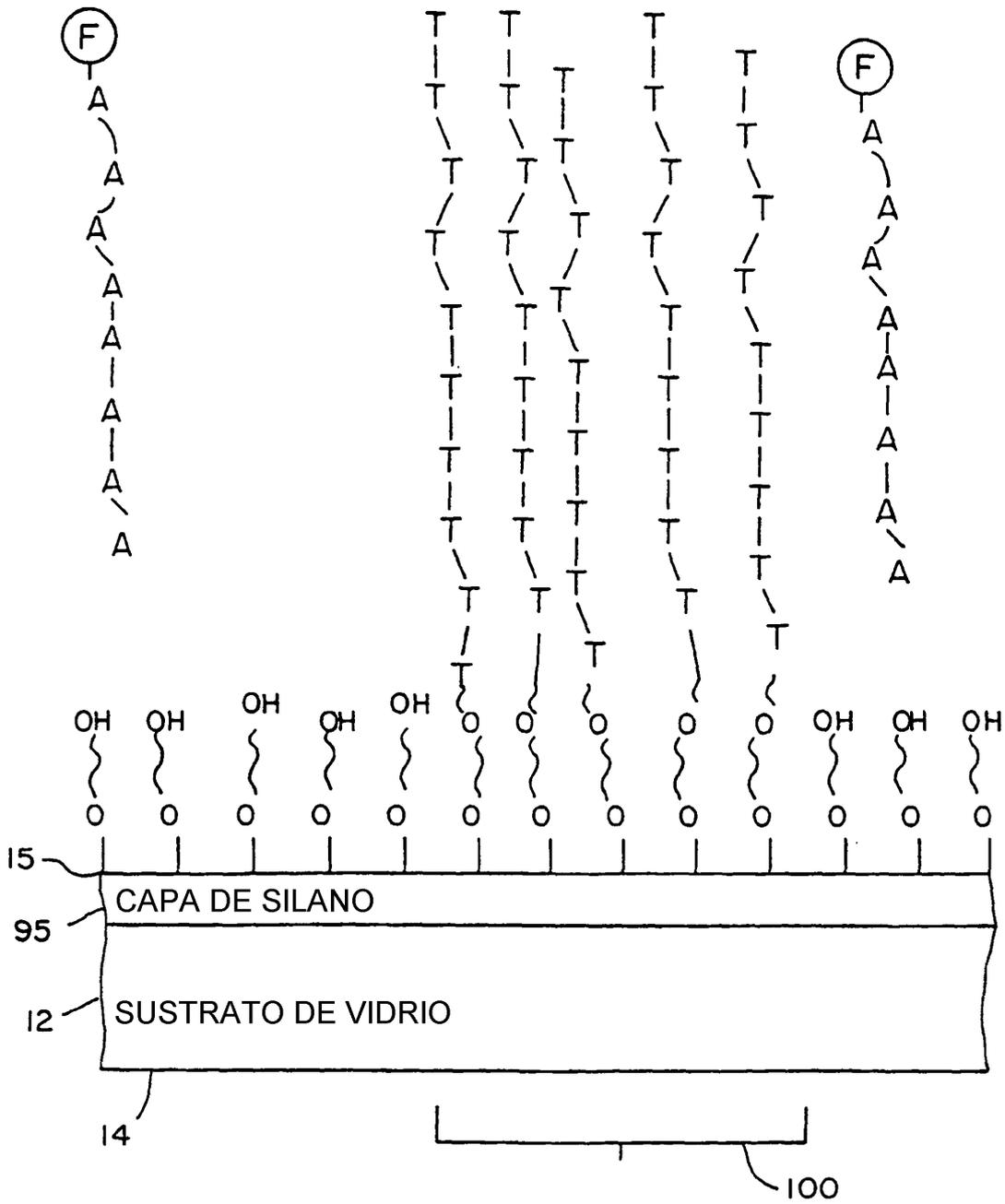


FIG. 14