

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 101**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 15191406 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 3032251**

54 Título: **Plataformas de separación y detección microfluídicas de plástico**

30 Prioridad:

04.04.2007 US 921802 P

13.08.2007 US 964502 P

12.02.2008 US 28073

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

27.06.2018

73 Titular/es:

ANDE CORPORATION (100.0%)

266 Second Avenue

Waltham, MA 02451 , US

72 Inventor/es:

TAN, EUGENE;

KAN, CHEUK WAI y

LAM, HEUNG CHUAN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 674 101 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

Plataformas de separación y detección microfluidicas de plástico

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación, en virtud del 35 U.S.C. §119(e), de la solicitud provisional estadounidense con el número de serie 60/921.802, presentada el 4 de abril de 2007; y la solicitud provisional estadounidense con el número de serie 60/964.502 presentada el 13 de agosto de 2007 y la solicitud provisional estadounidense con el número de serie 61/028.073, presentada el 12 de febrero de 2008.

Campo de la invención

10 Esta invención está en el campo de la secuenciación y el dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos por electroforesis con detección por fluorescencia inducida por láser. El análisis se lleva a cabo en chips de electroforesis de plástico.

Antecedentes de la invención

15 Desde el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de ADN en la década de 1970 (Maxam y Gilbert, 1977, *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564; Sanger *et al.*, 1977, *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467), se ha desarrollado una amplia gama de aplicaciones que hacen uso de estas tecnologías. En paralelo, se ha introducido instrumentación cada vez más sofisticada para llevar a cabo la secuenciación de ADN. Por ejemplo, en 1986, Applied Biosystems comercializó un secuenciador de ADN automatizado basado en la separación de fragmentos de ADN generados por el método de secuenciación de Sanger; los fragmentos de ADN se marcaron con un conjunto de cuatro colorantes fluorescentes y se separaron por electroforesis capilar (Smith *et al.*, 1986, *Nature* 321: 674-679).
20 Como resultado, la secuenciación de Sanger ha sido la tecnología de secuenciación más ampliamente usada durante las últimas tres décadas.

Más recientemente, se ha desarrollado y continúa desarrollándose una variedad de nuevas tecnologías de secuenciación e instrumentación relacionada. Denominadas métodos de "próxima generación" (revisados en Metzker, 2005, *Genome Research* 15: 1767-1776), estas químicas incluyen pirosecuenciación, secuenciación por ligación y secuenciación de moléculas individuales. Un objetivo principal que impulsa la investigación en tecnologías de secuenciación de próxima generación es en general llevar a cabo secuenciación genómica de alto rendimiento, y en particular reducir el coste de obtener una secuencia genómica completa. Aunque el coste por par de bases de tecnologías de próxima generación puede ser en algunos casos menos que el de la secuenciación de Sanger, todos estos métodos (incluyendo Sanger) son costosos y requieren tiempo, esfuerzo y equipos de laboratorio sustanciales.

30 El énfasis actual en obtener cantidades muy grandes de datos de secuencias a partir de un genoma dado no invalida el valor de obtener rápidamente cantidades relativamente pequeñas de secuencia genómica. Por ejemplo, muchas enfermedades humanas comunes pueden diagnosticarse basándose en menos de 1000 pares de bases de secuencias de ADN, órdenes de magnitud menos que lo requerido para generar un genoma humano completo. De forma similar, la determinación precisa de los tamaños de conjuntos de menos de 20 fragmentos de ADN específicos generados por análisis de repeticiones en tándem cortas es suficiente para identificar a un individuo dado.

35 Hay una necesidad no satisfecha de desarrollar instrumentos y tecnologías que permitan el análisis de ácidos nucleicos dirigido, definido como identificación rápida (por secuenciación o dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos) de un subconjunto de un genoma de ser humano, animal o patógeno dado. El análisis de ácidos nucleicos dirigido permitirá a los usuarios finales tomar decisiones clínicas, forenses u otras casi en tiempo real. Dependiendo de la aplicación, se pueden llevar a cabo análisis de ácidos nucleicos dirigidos en una variedad de entornos, incluyendo laboratorios hospitalarios, consultorios médicos, junto al paciente o, en el caso de aplicaciones forenses o medioambientales, en el campo.

40 Con respecto a la secuenciación de ácidos nucleicos (ADN y ARN), las aplicaciones clínicas incluyen diagnóstico de enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas (incluyendo la determinación de perfiles de resistencia a fármacos de los organismos), cáncer (incluyendo la determinación de la capacidad de respuesta a regímenes quimioterápicos) y enfermedades heredadas y otras enfermedades comunes (incluyendo la determinación de la capacidad de respuesta a medicaciones). La secuenciación de ácidos nucleicos dirigida también es adecuada para análisis farmacogenómico y ciertas aplicaciones forenses (incluyendo, por ejemplo, secuenciación de ADN mitocondrial).

45 Con respecto al dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos, el análisis de ácidos nucleicos dirigido se puede usar en aplicaciones clínicas y forenses. Por ejemplo, un tipo de identificación en seres humanos se basa en un análisis de repeticiones en tándem cortas (STR) (Edwards *et al.*, 1991, *Am J Hum Genet* 49(4):746:756). En el análisis de STR, se usan una serie de cebadores para amplificar ciertas regiones genómicas que contienen números variables de ciertas repeticiones en tándem cortas. Los tamaños de las bandas resultantes se determinan por dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos (normalmente usando electroforesis capilar), y el tamaño de cada miembro del conjunto de alelos STR identifica de manera única a un individuo. El tipado por STR se ha
55 convertido en la norma mundial para la identificación genética forense de seres humanos y es la única tecnología

biométrica que permite la identificación de un individuo así como de parientes genéticos de ese individuo. En aplicaciones clínicas, se puede usar el dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos para diagnosticar un trastorno dado (por ejemplo, buscando una delección o inserción característica, o determinando el tamaño de regiones de repetición de nucleótidos como en la ataxia de Friedreich (Pandolfo, M., 2006, *Methods Mol. Med* 126: 197-216). El dimensionamiento de fragmentos también es útil para la identificación de agentes infecciosos; la huella de ADN se puede usar en el diagnóstico de patógenos.

Las aplicaciones de análisis de ácidos nucleicos dirigidos no se limitan a las comentadas anteriormente. Los análisis de ácidos nucleicos dirigidos se pueden usar para identificar agentes de armas biológicas en muestras clínicas y medioambientales tanto por secuenciación como por dimensionamiento de fragmentos. Las aplicaciones de pruebas de alimentos y veterinarias también son un reflejo de las descritas anteriormente. Las aplicaciones de identificación veterinarias tales como cría y seguimiento de caballos de carreras, cría de ganado e identificación de mascotas, también están dentro del alcance de los usos de la invención dada a conocer. Las aplicaciones de investigación de análisis de ácidos nucleicos dirigidos son numerosas. En resumen, el análisis de ácidos nucleicos dirigido tiene el potencial de transformar drásticamente varias industrias.

Los secuenciadores basados en capilares de alto rendimiento existentes y los secuenciadores de próxima generación no pueden llevar a cabo análisis de ácidos nucleicos dirigidos de una manera oportuna y rentable. Los ahorros de escala buscados por estas tecnologías se ven impulsados por la reducción de los costes de obtener y analizar cantidades muy grandes de datos de secuencias. Para que instrumentos y sistemas que pueden realizar un análisis de ácidos nucleicos dirigido lleguen a formar parte del uso rutinario, deben diseñarse para presentar ciertas propiedades y características "ideales". En particular, los instrumentos y sistemas deben generar resultados rápidamente (de manera ideal en el plazo de minutos) para permitir la generación de datos accionables lo más rápidamente posible. Deben ser fáciles de hacer funcionar y los reactivos y consumibles deben ser económicos. Además, para algunas aplicaciones es útil que las separaciones de ácidos nucleicos se lleven a cabo en productos desechables; esto reduce drásticamente la posibilidad de contaminación de muestras. Para lograr estas propiedades, los biochips basados en polímeros son más adecuados como sustratos de separación que otros materiales tales como vidrio y silicio.

Se notificó un intento de lograr el dimensionamiento de fragmentos de ADN en chips de plástico por McCormick (*Anal Chem* 69(14):2626 1997) que muestra la separación de fragmentos de restricción *HaeIII* de ADN de Φ X174 RF. Las separaciones se llevaron a cabo con muestras individuales en chips de un único carril, pero no obstante mostraron separaciones de resolución escasa y sensibilidad escasa. Además, el sistema sólo pudo detectar la emisión de un único fluoróforo. Sassi (*J Chromatogr A*, 894(1-2):203 2000) notificó el uso de chips acrílicos que consistían en 16 carriles de separación aislados de manera fluidica para el dimensionamiento de STR, pero este enfoque también mostró un poder de resolución escaso y sensibilidad baja. Esta sensibilidad de sistema baja impidió la detección de escaleras alélicas (patrones de dimensionamiento internos requeridos estrictamente en análisis forenses) cuando se llevan a cabo separación y detección simultáneas en 16 carriles. El uso de una velocidad de exploración de 2 Hz, que representa un intento de aumentar la relación señal/ruido del sistema, provocó la degradación tanto del poder de resolución como de la precisión. Finalmente, el sistema sólo pudo detectar la emisión a partir de un único fluoróforo. Shi (*Electrophoresis* 24(19-20):3371 2003 y Shi, 2006, *Electrophoresis* 27(10):3703) notificó la separación y detección de 2 y 4 colores en dispositivos de separación de plástico de un único carril, de una única muestra. Aunque se notificó que el canal de 4,5 cm proporcionaba resolución de una única base, en realidad la resolución es escasa como se demuestra por la aparición de alelos separados por un par de bases (la razón de pico con respecto a valle de los alelos de TH01 9.3 y 10 se aproxima a uno). En este estudio se usaron dispositivos con canales de separación más largos (6, 10 y 18 cm) para lograr resolución más alta para el análisis en comparación con los dispositivos de 4,5 cm. La resolución de los dispositivos de 10 y de 18 cm de longitud estaba limitada ya que los dispositivos se deslaminaron cuando se usaron composiciones de matrices de cribado optimizadas para su resolución.

En la práctica, se ha encontrado que los plásticos presentan varios obstáculos importantes para su uso en biochips diseñados para secuenciación y dimensionamiento de fragmentos de ácidos nucleicos. La autofluorescencia de materiales de plástico interfiere con la detección de longitudes de onda en el rango visible de 450 a 800 nm (Piruska, 2005, *Lab Chip* 5(12):1348; Wabuyele, 2001 *Electrophoresis* 22(18):3939-48; Hawkins y Yager 2003 *Lab Chip*, 3(4): 248-52).

Estas longitudes de onda se usan en kits comerciales para secuenciación de Sanger y dimensionamiento de STR. Además, los dispositivos de plástico existentes tienen fuerzas de unión bajas con sustratos usados comúnmente y malos resultados de rendimiento con matrices de cribado usadas comúnmente. Finalmente, las superficies internas del canal interaccionan con las matrices de cribado y las muestras de ADN dando como resultado una resolución escasa debido al flujo electroosmótico y a interacciones de ADN con pared (Kan, 2004, *Electrophoresis* 25(21-22):3564).

Por consiguiente, hay una necesidad no satisfecha sustancial de un biochip de plástico de múltiples carriles, económico, que pueda llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos dirigido a resolución alta y con una alta relación señal/ruido.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona biochips de plástico de múltiples carriles, económicos, que pueden llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos dirigido a resolución alta y con una alta relación señal/ruido y métodos para utilizar tales chips.

- 5 La invención se define por un aparato según la reivindicación 1. En las reivindicaciones 2-15 se definen aspectos adicionales de dicho aparato.

Realizaciones preferidas específicas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 ilustra un chip de separación y detección microfluídico según las diversas realizaciones de la invención.
- La figura 2 ilustra capas de soporte y de chip separadas que se pueden usar para construir un chip de separación y detección microfluídico según las diversas realizaciones de la invención.
- La figura 3 ilustra capas de dispositivo separadas que se pueden usar para construir un chip de separación y detección microfluídico según las diversas realizaciones de la invención.
- 15 La figura 4 ilustra una vista ampliada de la sección de ánodo de un chip de separación y detección microfluídico según las diversas realizaciones de la invención.
- La figura 5 ilustra un chip de separación y detección microfluídico que tiene canales de inyección según las diversas realizaciones de la invención.
- 20 La figura 6 es un diagrama esquemático de un chip de separación y detección microfluídico según las diversas realizaciones de la invención.
- La figura 7 ilustra el apilamiento usado para el estampado.
- La figura 8 ilustra un soporte de chip que se fabrica por fresado de CNC a partir de una lámina acrílica de 3/8" de grosor (GE Plastics); (arriba) vista desde arriba; abajo (vista lateral).
- 25 La figura 9 es un espectro de fluorescencia que demuestra la baja autofluorescencia del chip de plástico en comparación con chips de separación de vidrio típicos; (a) chip de plástico ensamblado (Pchip2); (b) chip de plástico ensamblado (Pchip1); (c) sólo capa de revestimiento de plástico; (d) chip de vidrio, 1,4 mm de grosor; (e) chip de vidrio de 0,7 mm de grosor; (f) sólo sustrato de plástico.
- La figura 10 es un perfil denominado de alelos para la escalera alélica a partir de un kit marcado de 5 colores (kit ABI AmpFISTR Identifier); de arriba a abajo: señales de detector azul, verde, amarilla, roja, naranja.
- 30 La figura 11 es un perfil de STR denominado de alelos para el ADN genómico humano 9947A, de arriba a abajo: señales de detector azul, verde, amarilla, roja, naranja; el perfil completo se logra a 1,0 ng de molde de ADN.
- La figura 12 muestra la resolución con $R > 0,4$ para hasta 480 pb, demostrando la resolución de una única base hasta 480 pb; de arriba a abajo: señales de detector azul, verde, amarilla, roja, naranja.
- La figura 13 muestra la resolución de 2 alelos (THO1 9.3 y 10) que están separados por 1 nucleótido.
- 35 La figura 14 es un análisis de secuenciación de ADN de fragmento de pGEM; de arriba a abajo: señales de detector azul, verde, amarilla y roja.
- La figura 15 es una gráfica de cuatro pares de bases compuesta que muestra un análisis de secuenciación de ADN de un fragmento de pGEM.
- 40 La figura 16 es un diagrama esquemático de descomposición de un diseño de chip para inyección de muestra electrocinética directa que muestra las capas de soporte (arriba) y de chip (abajo).

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona chips de separación de plástico que pueden detectar la separación de especies de ácidos nucleicos que difieren en tamaño en aproximadamente 1 par de bases, y a niveles de concentración de al menos 1,0 ng de molde de ADN.

- 45 El nivel de muestra más bajo que va a analizarse para análisis de STR consiste en un molde de ácido nucleico con menos de 800 copias, menos de 400 copias, menos de 200 copias, menos de 100 copias, menos de 50 copias, menos de 30 copias, menos de 10 copias o 1 copia de molde de ácido nucleico antes de la reacción de PCR

multiplexada. La muestra de concentración más baja que va a analizarse para la secuenciación consiste en un molde de ácido nucleico con menos de 0,5 pmol, menos de 0,1 pmol, menos de 0,01 pmol como entrada para la reacción de secuenciación de Sanger.

5 La frase “canal de inyección” según se usa en el presente documento, significa un canal intersecante que permite la introducción de una muestra en el interior del canal microfluido con el cual interseca. El canal intersecante puede estar en configuración de un único canal transversal, una única unión en T o una unión en T doble desviada.

10 La frase “comunicación de fluido” según se usa en el presente documento, se refiere a dos cámaras, u otros componentes o regiones que contienen un fluido, conectados entre sí de forma que un fluido puede fluir entre las dos cámaras, componentes o regiones. Por tanto, dos cámaras que están en “comunicación de fluido” pueden, por ejemplo, estar conectadas entre sí por un canal microfluido entre las dos cámaras, de forma que un fluido puede fluir libremente entre las dos cámaras. Tales canales microfluido pueden incluir opcionalmente una o más válvulas en los mismos que pueden cerrarse u ocluirse con el fin de bloquear y/o controlar de otra forma la comunicación de fluido entre las cámaras.

15 La frase “colorante fluorescente” según se usa en el presente documento, significa que el colorante, tras la excitación con una fuente de luz, emite luz que tiene una longitud de onda de 380-850 nm. Preferiblemente, el colorante emite luz que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 450-800 nm; más preferiblemente, el colorante emite luz que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 495-775 nm.

El término “autofluorescencia” según se usa en el presente documento, significa fluorescencia producida por sustancias distintas del fluoróforo de interés bajo irradiación de luz.

20 La frase “esencialmente no emite fluorescencia” según se usa en el presente documento, significa que la señal de fluorescencia de fondo (por ejemplo, entre 500-800 nm) del objeto al que se hace referencia (por ejemplo, sólido o disolución) cuando se somete a irradiación de luz (por ejemplo, a una o más longitudes de onda entre 450-500 nm; en particular, 488 nm; irradiación láser) tiene un nivel de fondo que es más bajo que el de dispositivos microfluidicos de vidrio convencionales que consisten en vidrio Borofloat de 0,7 mm de grosor.

25 El término “polímeros basados en norborneno” según se usa en el presente documento significa un polímero preparado a partir de al menos un monómero que comprende un resto norborneno en el que los monómeros que contienen norborneno se polimerizan según polimerización de metátesis de apertura de anillos según métodos conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.945.135; 5.198.511; 5.312.940; y 5.342.909).

30 El término “poli(metacrilato de metilo) o “PMMA”, según se usa en el presente documento, significa los polímeros sintéticos de metacrilato de metilo, incluyendo, pero sin limitarse a, los comercializados con los nombres comerciales Plexiglas™, Limacryl™, R-Cast™, Perspex™, Plazcryl™, Acrylex™, ACrylite™, ACrylplast™, Altuglas™, Polycast™ y Lucite™, así como los polímeros descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.561.208, 5.462.995 y 5.334.424.

35 El término “policarbonato” según se usa en el presente documento significa un poliéster de ácido carbónico y glicol o un fenol divalente. Ejemplos de tales glicoles o fenoles divalentes son p-xililenglicol, 2,2-bis(4-oxifenil)propano, bis(4-oxifenil)metano, 1,1-bis(4-oxifenil)etano, 1,1-bis(oxifenil)butano, 1,1-bis(oxifenil)ciclohexano, 2,2-bis(oxifenil)butano y mezclas de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, las comercializadas con los nombres comerciales Calibre™, Makrolon™, Panlite™, Makroclear™, Cyrolon™, Lexan™ y Tuffak™.

40 Según se usa en el presente documento, se pretende que el término “ácido nucleico” abarque ADN y ARN de cadena sencilla y doble, así como todas y cada una de las formas de ácido nucleico alternativo que contienen bases, azúcares y estructuras principales modificados. Por tanto, se entenderá que el término “ácido nucleico” incluye, pero no se limita a, ADN o ARN de cadena sencilla y doble (y formas de los mismos que pueden ser parcialmente de cadena sencilla o parcialmente de cadena doble), ADNc, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (“ANP”), ADN 2'-5' (un material sintético con una estructura principal acortada que tiene un espaciamiento de bases que coincide con la conformación A del ADN; el ADN 2'-5' normalmente no se hibridará con ADN en forma B, pero se hibridará fácilmente con ARN) y ácidos nucleicos bloqueados (“LNA”). Los análogos de ácidos nucleicos incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión, hibridación y formación de pares de bases similares o mejoradas. En la técnica se conocen bien formas “análogas” de purinas y pirimidinas e incluyen, pero no se limitan a, aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina. Los análogos de la estructura principal de ADN proporcionados por la invención incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquil-fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino-carbamato y ácidos nucleicos peptídicos (ANP), uniones metilfosfonato o uniones metilfosfonato y fosfodiéster alternantes (Strauss-Soukup, 1997, Biochemistry 36:8692-

8698) y uniones bencilfosfonato, según se comenta en el documento US 6.664.057; véase también *Oligonucleotides And Analogues, A Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, volumen 600, eds. Baserga and Denhardt (NYAS 1992); Milligan, 1993, *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los ácidos nucleicos en el presente documento se pueden extraer de células o preparar sintéticamente según cualquier medio conocido por los expertos en la técnica; por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o someterse a transcripción o transcripción inversa a partir de ADNc o ARNm, entre otras fuentes.

El término "vía" según se usa en el presente documento significa un orificio pasante formado en un material sólido para permitir la conexión de fluido entre las superficies superior e inferior del material.

En la figura 1 se muestra un chip de electroforesis a modo de ejemplo según diversas realizaciones de la invención. El chip (100) comprende una parte de ánodo (101), una parte de cátodo (102) y una parte central (103) entre las partes de ánodo y de cátodo. La parte de cátodo comprende al menos una primera vía (104) y la parte de ánodo comprende al menos una segunda vía (105). La parte central comprende una pluralidad de canales microfluídicos (106) y una ventana de detección (107), teniendo cada canal microfluídico una región de separación y una región de detección; en las que cada canal microfluídico está en comunicación de fluido con al menos una primera vía y al menos una segunda vía. La pluralidad de canales microfluídicos está sustancialmente en el mismo plano y no se intersecan entre sí dentro de la parte central. Cada canal microfluídico tiene una región en la que puede tener lugar la excitación y/o detección de la muestra. La zona en la que están abarcadas las regiones de excitación y detección de la pluralidad de canales microfluídicos se conoce como la ventana de detección, y esta ventana comprende un plástico fino.

La frase "plástico fino" según se usa en el presente documento, significa que el material al que se hace referencia comprende un plástico que tiene un grosor de (su dimensión más pequeña) menos de 1 mm, menos de 750 μm , menos de 650 μm , menos de 500 μm , menos de 400 μm , menos de 300 μm , menos de 200 μm o menos de 100 μm ; o que el material al que se hace referencia comprende un plástico que tiene un grosor que oscila entre 25-2000 μm , 25-1000, 25-750 μm , 25-500 μm , 25-400 μm , 25-300 μm o 25-200 μm . Aunque el chip está diseñado para ser fino en la ventana de detección, partes del chip fuera de la región de detección pueden tener el mismo grosor o un grosor que es mayor que el de la región de detección.

El chip de la figura 1 se muestra por razones de ilustración como que tiene cuatro canales microfluídicos, sin embargo no se pretende que tal divulgación sea limitativa, en vez de eso, un experto en la técnica reconocerá fácilmente que el chip puede contener números alternativos de canales microfluídicos (véase a continuación) incluyendo chips con un canal y chips con dos o más canales. El término "pluralidad" según se usa en el presente documento, significa dos o más, cuatro o más, ocho o más, 16 o más, 32 o más, 48 o más, 64 o más, 96 o más, 128 o más, 256 o más, 384 o más, 512 o más, o 1024 o más; o 2-4, 2-8, 2-16, 2-32, 2-48, 2-64, 2-96, 2-128, 2-384, 2-512, 2-1024 canales microfluídicos.

El chip (250) comprende una capa de sustrato (360) y una capa de revestimiento (370) según se muestra en la figura 3. Una pluralidad de ranuras (361) están dispuestas a modo de patrón en la capa de sustrato. Una serie de vías (es decir, orificios pasantes) (371, 372) están formadas en la capa de revestimiento para proporcionar acceso fluido a los canales microfluídicos, y pueden estar ubicadas en los extremos de los canales microfluídicos en las partes de ánodo y de cátodo del chip. Alternativamente, se pueden formar vías en la capa de sustrato en vez de en la capa de revestimiento para lograr la misma funcionalidad. La superficie superior de la capa de sustrato está unida con la superficie inferior de la capa de revestimiento para formar los canales microfluídicos. Las técnicas para fabricar sistemas microfluídicos basados en polímeros se revisaron extensamente por Becker y Gartner (Becker, 2000, *Electrophoresis* 21: 12-26 y Becker, 2008, *Electrophoresis* 390(1):89). Se pueden usar varios de estos procedimientos para fabricar el chip de separación de plástico descrito en el presente documento.

En particular, los presentes chips de separación de plástico se pueden preparar por estampado en caliente de películas termoplásticas finas con un modelo maestro del negativo de la estructura que va a producirse. El modelo maestro se puede preparar usando electroconformación para replicar el dispositivo preparado en un sustrato sólido. El sustrato sólido puede ser láminas de vidrio en las que se dispone un patrón por métodos de grabado fotolitográfico y químico convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Las capas de sustrato y de revestimiento se unen por difusión por la aplicación de calor y presión.

Las capas de sustrato y de revestimiento del chip pueden construirse a partir de una variedad de sustratos de plástico incluyendo, pero sin limitarse a, polietileno, poliacrilatos (por ejemplo, poli(metacrilato de metilo)), policarbonatos y polímeros de olefinas cíclicas (COP) insaturados, parcialmente insaturados o saturados, o copolímeros de olefinas cíclicas (COC) insaturados, parcialmente insaturados o saturados (por ejemplo, ZEONOR™, ZEONEX™ o TOPAS™). En particular, COP y COC son ventajosos para las presentes aplicaciones de chips ya que muestran ópticamente una autofluorescencia inherentemente menor en el rango de longitud de onda visible en comparación con otros polímeros.

El grosor de capas de sustrato de plástico y de revestimiento usadas en el presente procedimiento se mantiene fino para minimizar la autofluorescencia a partir del chip. Las capas de sustrato y de revestimiento de plástico pueden

tener cada una, independientemente, un grosor de menos de 200 μm o menos de 100 μm ; o las capas de sustrato de plástico y de revestimiento pueden comprender cada una, independientemente, un plástico que tiene un grosor que oscila entre 25-200 μm o 25-100 μm .

5 En una realización, como se muestra a modo de ejemplo en la figura 2, el chip (250) está unido a un soporte (201) que tiene una superficie superior e inferior, que comprende una parte de ánodo (202), una parte de cátodo (203) y una parte central (204) entre las partes de ánodo y de cátodo, en el que la parte central comprende una ventana de detección (205), la parte de ánodo comprende al menos un pocillo de ánodo (206), y la parte de cátodo comprende al menos un pocillo de cátodo (207). La superficie superior del chip, con los orificios de vía hacia arriba, está en contacto con la superficie inferior del soporte, y el chip se une fijamente al soporte. El chip puede unirse al soporte
10 según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, unión por difusión, unión por disolvente o unión adhesiva.

La capa de soporte puede construirse a partir de una variedad de sustratos de plástico incluyendo, pero sin limitarse a, polietileno, poliácridatos (por ejemplo, poli(metacrilato de metilo)), policarbonatos y polímeros de olefinas cíclicas (COP) insaturados, parcialmente insaturados o saturados, o copolímeros de olefinas cíclicas (COC) insaturados, parcialmente insaturados o saturados (por ejemplo, ZEONOR™, ZEONEX™ o TOPAS™). El grosor de capas de soporte de plástico usadas en el presente procedimiento es suficientemente grueso con el fin de proporcionar rigidez estructural y permitir suficiente volumen de muestra y tampones en los depósitos. El grosor del soporte de plástico oscilará entre 100-15.000 μm .

20 Cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos puede tener una profundidad de al menos 10 μm , 50 μm , 100 μm , 200 μm , 500 μm o 1 mm; o tener una profundidad que oscila entre 1-1000 μm , 10-100 μm , 10-50 o 25-50 μm . La pluralidad de canales microfluídicos puede tener una anchura de al menos 25 μm , 50 μm , 100 μm , 200 μm , 500 μm o 1 mm; o tener una anchura que oscila entre 25-1.000 μm , 25-200 μm o 50-200 μm . La sección transversal de microcanal de cada canal puede tener una sección transversal sustancialmente cuadrada, rectangular, circular, semicircular, elíptica, triangular o trapezoidal. Un experto en la técnica reconocerá que los canales microfluídicos pueden ser uniformes en profundidad, anchura y sección transversal o no.

25 Cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos (106) comprende una región de separación (108) y una región de detección (109). La región de separación tiene normalmente canales con una longitud de separación de aproximadamente 2-50 cm, 10-50 cm, 2-25 cm, 10-25 cm. La longitud de separación se define como la parte del canal entre el punto de inyección de muestra y el punto de detección de muestra. La longitud de separación es normalmente menos que la longitud total del canal de separación que se extiende entre los depósitos de cátodo y de ánodo.

30 El análisis simultáneo de una pluralidad de muestras se puede llevar a cabo inyectando y apilando cada una de las muestras en un canal de separación separado dentro de cualquiera de los chips de separación descritos en el presente documento. La aplicación de un campo eléctrico a lo largo del canal de separación hace que las muestras migren a lo largo del canal desde la parte de cátodo hacia la parte de ánodo o de la parte de ánodo a la parte de cátodo del canal de separación, dependiendo, por ejemplo, de las cargas presentes en las superficies del canal (véase a continuación), según resultará familiar para los expertos en la técnica. La migración de la muestra a través de una matriz de cribado separa especies basándose en el tamaño.

35 A medida que las muestras separadas pasan a través de la ventana de detección pueden excitarse los marcadores de colorante unidos a cada especie dentro de la muestra y puede detectarse la fluorescencia resultante. La ventana de detección normalmente se solapa con la región de detección de cada uno de la pluralidad de microcanales en los extremos terminales de la región de separación de cada uno de los canales. Normalmente, la región de detección para cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos está sustancialmente en la misma ubicación a lo largo de los canales, de manera que la ventana de detección puede estar en una única ubicación en la parte central del soporte.

40 De manera ventajosa se proporciona con el chip un inyector para inyectar simultáneamente una pluralidad de muestras al interior de la pluralidad de pocillos de muestra o de tampón para permitir la separación y detección simultáneas de múltiples muestras. Tales inyectores proporcionan, por ejemplo, una muestra de la pluralidad de muestras a un canal microfluídico de la pluralidad de canales microfluídicos. Los inyectores pueden introducir las muestras en los canales según cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, por transporte electroforético, accionamiento neumático o accionamiento de líquidos a través de una aguja o tubo o canal que conecta la muestra con el canal de separación.

45 En determinadas realizaciones, se pueden cargar muestras dentro del chip a través de los depósitos de cátodo del chip. Un volumen de inyección de cada muestra se puede introducir a través de uno de los pocillos de cátodo según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la muestra se puede inyectar por medio de polarización apropiada del canal de separación y/o de un canal transversal del canal de separación y los pocillos de muestra y de desecho de manera que una parte de la muestra (es decir, el volumen de inyección) en el pocillo de muestra se proporciona al canal de separación. Tras la inyección de la muestra, se introduce disolución de tampón adicional al interior de cada pocillo de cátodo; se puede proporcionar un volumen suficiente para diluir cualquier

muestra restante en el pocillo. Por ejemplo, se introduce en los pocillos de cátodo un volumen de tampón que es aproximadamente al menos 5, 10, 25, 50 ó 100 veces el volumen de inyección de la muestra. Alternativamente, se introduce en los pocillos de cátodo un volumen de tampón que oscila entre aproximadamente 5-100 veces, 5-50 veces o 10-50 veces el volumen de inyección de la muestra.

5 En otras realizaciones, cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos comprende además un canal de inyección para introducir muestras. Por ejemplo, se hace referencia a la figura 4; en la misma se muestra una vista ampliada de un chip (400) que muestra la parte de cátodo (401) y la sección adyacente de la parte central (403). La parte de cátodo comprende al menos una segunda vía (405) y la parte central comprende una pluralidad de canales microfluídicos (406). Cada canal microfluídico comprende además, dentro de la parte de cátodo del chip, un canal de inyección (408) que comprende un pocillo de muestra (409) y de desecho (410) para cada canal microfluídico.

10 El canal de inyección puede estar en configuración de un único canal transversal (como se ilustra en la figura 4), una única unión en T o una unión en T doble desviada. En algunas realizaciones, el canal de inyección está en una configuración de unión en T doble desviada que minimiza el volumen de inyección de muestra, mejorando de este modo la resolución de separación. La inyección de una muestra desde el canal de inyección hasta el canal microfluídico se puede lograr según métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo inyección electroforética a través de aplicación de los potenciales apropiados en los pocillos de muestra, de desecho, de ánodo y de cátodo.

15 En la figura 5 se ilustra una realización alternativa del chip de separación y detección microfluídico. El chip (500) comprende una parte de ánodo (501), una parte de cátodo (502) y una parte central (503). La parte de cátodo comprende una primera vía (504) para cada canal microfluídico (506) y la parte de ánodo comprende al menos una segunda vía (505) para cada canal microfluídico (506). La parte central comprende una pluralidad de canales microfluídicos (506) y una ventana de detección (507), teniendo cada canal microfluídico una región de separación y una región de detección; en la que cada canal microfluídico está en comunicación de fluido con una primera vía y una segunda vía. La pluralidad de canales microfluídicos están esencialmente en el mismo plano y no se intersecan entre sí dentro de la parte central. La ventana de detección comprende un plástico fino y se solapa con la región de detección de cada canal microfluídico.

20 En este caso, los canales de inyección se omiten en favor de una vía de ánodo (segunda) y de cátodo (primera) para cada canal microfluídico. Se introduce un volumen de inyección de cada muestra a través de una de las vías de cátodo según métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase anteriormente). Tras la inyección de muestra, se introduce disolución de tampón adicional al interior de cada pocillo de tampón de cátodo; se proporciona ventajosamente suficiente volumen para diluir cualquier muestra restante en el pocillo, mediando de este modo cualquier señal de fondo introducida a partir de la inyección de muestra prolongada y mejorando la relación señal/ruido observada en la ventana de detección. Por ejemplo, se introduce un volumen de tampón al interior de los pocillos de cátodo que es aproximadamente al menos 5, 10, 25, 50 ó 100 veces el volumen de inyección de la muestra. Alternativamente, se introduce un volumen de tampón dentro de los pocillos de tampón de ánodo que oscila entre aproximadamente 5-100 veces, 5-50 veces o 10-50 veces el volumen de inyección de la muestra.

25 La separación electroforética de las muestras dentro de los canales microfluídicos se proporciona por la aplicación de una diferencia de potencial a lo largo de los microcanales en el microchip. Se puede aplicar un voltaje alto a lo largo de los extremos de los microcanales, normalmente colocando un cátodo y un ánodo en el pocillo de cátodo y el pocillo de ánodo, respectivamente, estableciendo un campo eléctrico a lo largo de la parte de separación del canal microfluídico, y moviendo la muestra (por ejemplo, ácido nucleico) desde el extremo del cátodo a través de la parte de separación hasta la parte de detección, y finalmente, al ánodo. El campo eléctrico requerido para la separación eficiente oscila a menudo entre 50 V/cm y 600 V/cm. El voltaje desde la fuente de alimentación se aplica a través de electrodos y se usa un tampón en el depósito de ánodo y de cátodo para proporcionar contacto eléctrico entre el electrodo y el polímero de cribado.

30 Los voltajes altos requeridos para la separación de muestra se aplican al canal de separación con electrodos que están en contacto con el tampón que está en los pocillos de ánodo y de cátodo. Debido a los voltajes altos presentes en los electrodos que están en contacto con el tampón, las moléculas de agua del tampón se hidrolizan dando como resultado la formación de OH^- , H^+ y gas H_2 . Esta formación da como resultado un cambio en el pH del tampón con el tiempo y la formación de burbujas dentro del tampón. El cambio de pH del tampón se puede atenuar a través del uso suficiente de una disolución de tampón en los depósitos de ánodo y de cátodo (por ejemplo, 1X TTE; Amresco) para proporcionar contacto entre el electrodo y la matriz de cribado. Las burbujas formadas dentro del tampón tienen una tendencia a migrar al interior de la matriz de cribado bloqueando el canal, dando como resultado una separación escasa de ácidos nucleicos.

35 Se puede impedir que las burbujas que se forman en el electrodo migren al interior del canal usando uno o una combinación de los siguientes métodos. En primer lugar, el electrodo dentro del depósito puede elevarse para alejar la fuente de generación de burbujas (electrodo) de los orificios de acceso en los canales. En segundo lugar, una frita de vidrio, frita polimérica o membrana polimérica o filtro polimérico se puede insertar entre el orificio de acceso de cátodo y el extremo del electrodo. En particular, una frita polimérica (por ejemplo, polieteretercetona, PEEK) se puede insertar entre el orificio de acceso de cátodo y el extremo del electrodo.

5 Se selecciona la frita, membrana o filtro para ser no conductor y tener un tamaño de poro que evita que las burbujas formadas en el electrodo pasen a través de los poros. Como resultado de la inserción de la frita, membrana polimérica o filtro entre el electrodo y la matriz de cribado, se impide que las burbujas formadas a partir del procedimiento de electrolisis entren en los canales. Esta implementación puede reducir y/o eliminar fallos que resultan del bloqueo de burbujas en los canales.

Dispositivos de separación para análisis simultáneos que consisten en una pluralidad de muestras se conectan eléctricamente de manera que se puede usar una fuente de alimentación común para polarizar la pluralidad de canales simultáneamente. Además, las limitaciones físicas del chip y el instrumento no permitirán habitualmente que todos los canales tengan una distribución física idéntica con respecto a longitud, profundidad y anchura.

10 Para lograr condiciones de inyección y separación electroforéticas sustancialmente idénticas para cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos, cada segmento de canal de los dispositivos individuales debe tener resistencias y por tanto campos eléctricos esencialmente idénticos. Un campo eléctrico sustancialmente idéntico, es decir en el que los campos eléctricos a través de cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos no difieren en más de aproximadamente +/-5%, se puede establecer ajustando simultáneamente la longitud, anchura y profundidades de cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos para ajustar la resistencia de cada segmento de los canales. La resistencia, R , de cada segmento se puede describir por la siguiente relación:

$$R = \rho \frac{l}{A}$$

donde ρ es la resistividad, l es la longitud y A es el área en sección transversal del canal.

20 Las cargas de superficie residentes en la pared de los canales del chip de separación pueden dar como resultado electroósmosis e interacciones de muestra con pared. Estos efectos se pueden minimizar aplicando un recubrimiento de superficie a las paredes internas de los canales microfluídicos. Tales modificaciones y recubrimientos de superficie pueden conseguirse a través de métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, Ludwig y Belder, 2003 *Electrophoresis* 24(15):2481-6).

25 Un gran número de candidatos para modificación de superficie están disponibles incluyendo hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), polidimetilacrilamida (PDMA), polivinilpirrolidona, dimetilacrilamida (DEA), dietilacrilamida (DEA), polidietilacrilamida (PDEA) y mezclas de los mismos, tales como PDMA:PDEA.

30 Adicionalmente, para su uso en aplicaciones electroforéticas, cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos se rellena ventajosamente con una matriz de cribado. Tales matrices de cribado pueden comprender, en ejemplo no limitativo, una poli(acrilamida lineal (PAA), polidimetilacrilamida (PDMA), polidietilacrilamida (PDEA), polivinilpirrolidona (PVP) y combinaciones de las mismas, incluyendo, por ejemplo, PVP:PAA, PDMA:PAA, PDEA:PAA, PDEA:PDMA:PAA. En determinadas realizaciones, la matriz de cribado comprende poli(acrilamida al 0,1-50% en peso. Varias de estas matrices de cribado también presentan capacidad de auto-recubrimiento dinámico. Tal como se pone en práctica usando estas realizaciones de los chips de separación electroforética de la invención, los ácidos nucleicos se mueven electroforéticamente a través de una matriz de cribado desde el extremo de ánodo hasta el de cátodo y se separan por tamaño en la misma. Como se expuso anteriormente, las paredes internas de los canales pueden revestirse para minimizar la influencia de la electroósmosis y las interacciones de ácido nucleico con pared.

40 La resolución, específicamente en el presente documento resolución electroforética, es la capacidad de distinguir de manera inequívoca dos picos separados en el tiempo (o por tamaño de bases). La resolución (R) se define por la siguiente ecuación

$$R = (2 \ln 2)^{1/2} \frac{t_2 - t_1}{\Delta b (hw_1 + hw_2)}$$

45 donde t es el tiempo de migración del n -ésimo pico, hw es la anchura total y mitad del máximo del n -ésimo pico y Δb es la diferencia en el número de bases entre los dos picos. La resolución de un único par de bases se define en el punto en el que R es mayor de 0,4. Visualmente, dos picos pueden distinguirse uno de otro cuando la razón de pico con respecto a valle es mayor de 0,7. Los requisitos tanto de R como de pico con respecto a valle deben cumplirse

con el fin de tener una resolución alta, y también se puede considerar que la resolución es característica de un intervalo de tamaños de fragmento. El intervalo de tamaños de fragmento para alelos en el análisis de STR oscila entre 90 y 400 pb y se requiere una resolución de un único par de bases a lo largo de este intervalo de tamaño de fragmento para el análisis de STR. Los tamaños de fragmento para el análisis de secuenciación alcanzan hasta 1200 pb. La capacidad de lograr longitudes de lectura largas y rendimiento de datos por carril está determinada, en parte, por el intervalo a lo largo del cual el chip puede generar resolución de un único par de bases.

El límite de detección para un sistema de detección óptico se define por la relación señal/ruido (SNR). Esta relación se define como la relación de una potencia de señal con respecto a la potencia de ruido (desviación estándar de potencia de ruido) que corrompe la señal. Una SNR alta indica una certeza más alta de que está presente una señal. Una relación señal/ruido de 3 se define generalmente como la que es aceptable para identificar con seguridad la presencia de una señal (Gilder, 2007, *J Forensic Sci.* 52(1): 97).

Cuando se analiza y detecta una pluralidad de especies de ácidos nucleicos en una muestra de ácidos nucleicos, la autofluorescencia del plástico en la ventana de detección del chip contribuye fuertemente al fondo de fluorescencia. Una característica ventajosa de los chips de separación electroforética de la invención es que se usa una ventana de detección fina para minimizar la fluorescencia de fondo del plástico. Este nivel de fondo se compara con Borofloat®, que es un sustrato comúnmente usado para fabricar chips de separación microfluídicos. Con el uso de una ventana de plástico fina, se puede detectar un mínimo de 1000 copias, 300 copias, 100 copias, 30 copias, 10 copias, 1 copia de ácido nucleico de molde en el procedimiento de PCR que genera fragmentos marcados fluorescentemente para su análisis. También se puede detectar un mínimo de 0,5 pmol, 0,1 pmol, 0,01 pmol o 0,001 pmol de molde de ácido nucleico para la reacción de secuenciación.

Aplicaciones de chips de separación y detección

Las aplicaciones de los diversos aspectos de la invención se extienden ampliamente tanto para identificación como para secuenciación de ácidos nucleicos. Los ejemplos de usos en identificación en seres humanos incluyen investigación forense criminal y seguridad nacional, por ejemplo identificación en puntos de control militares, fronteras y puertos, aeropuertos y sitios de catástrofes de grandes proporciones. Las aplicaciones de identificación veterinaria incluyendo cría y seguimiento de caballos de carreras, cría de ganado e identificación de mascotas también están dentro del alcance de los usos de los chips electroforéticos dados a conocer.

Además, los instrumentos de esta invención pueden volverse robustos y por tanto hacerse funcionar en el campo donde los resultados pueden usarse en tiempo real. Como tales, los instrumentos pueden usarse en puntos de control militares, fronteras y puertos, aeropuertos y sitios con gran número de víctimas.

Las aplicaciones de la tecnología a la secuenciación de ácidos nucleicos pueden dividirse en cuatro áreas: diagnósticos clínicos en seres humanos, incluyendo, por ejemplo, infecciones bacterianas y sensibilidades a anticuerpos, infecciones víricas (identificación y obtención de perfiles de resistencia a fármacos), enfermedades genéticas, trastornos complejos (asma, enfermedad cardíaca, diabetes) y farmacogenómica; diagnósticos clínicos veterinarios; secuenciación de investigación, incluyendo re-secuenciación y finalización; identificación de agentes de armas biológicas, incluyendo, por ejemplo, detección de *B. anthracis* y de virus del Ébola; y seguridad alimentaria. Siguen algunos ejemplos.

Un paciente con VIH necesita realización de pruebas de resistencia a fármacos. Actualmente, puede tardarse semanas en establecer la resistencia. Una cepa resistente a fármacos puede arraigar durante ese tiempo. Hay una necesidad no satisfecha de un instrumento y sistema que puedan proporcionar una respuesta en el plazo de 1-2 horas, mientras el paciente espera en el consultorio médico. El uso de un chip de separación electroforética según la invención permite una monitorización frecuente de resistencia a fármacos, un uso más rentable y efectivo desde el punto de vista clínico de agentes antivirales y mejores desenlaces en pacientes.

Un paciente con bacteriemia está en estado de choque. Actualmente, puede tardarse días en determinar si el agente causante es resistente a antibióticos y las identidades de los mismos. Mientras tanto, debe tratarse al paciente con antibióticos de amplio espectro, lo que puede provocar graves efectos secundarios al paciente y contribuye al aumento de la resistencia antibacteriana prevalente en la actualidad. Además, tales tratamientos pueden ser inferiores al óptimo. El uso de un chip de separación electroforética según la invención permite la identificación del perfil de resistencia a antibióticos del patógeno en 1-2 horas, conduciendo a un tratamiento más eficaz, dirigido, reducción de las toxicidades de antibióticos y mejores desenlaces en pacientes. Los beneficios para el paciente y para la salud pública son complementarios.

Un paciente con cáncer se está sometiendo a cirugía. Actualmente, se toma una muestra tumoral para anatomía patológica mientras el paciente está en la mesa de operaciones. Basándose en los resultados de las cepas de histopatología simple, se toma una decisión con respecto a lo agresivo que debe ser el cirujano. El uso de un chip de separación electroforética según la invención puede reemplazar a la histopatología con un diagnóstico de ácidos nucleicos definitivo del cáncer en menos de una hora, permitiendo que se tome una decisión quirúrgica mejor informada.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención y diversos usos de las mismas.

Se exponen sólo con fines explicativos y no deben considerarse limitativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de chip y electroforesis

5 Ejemplo 1A: *diseño de chip*

En la figura 6 se ilustra un diagrama esquemático de una realización particular de los dispositivos de la invención. Este dispositivo microfluídico consistía en 16 microcanales, cada uno con un inyector transversal de doble T. La dimensión en sección transversal del canal (90 μm de anchura y 40 μm de profundidad) y longitud del canal entre el ánodo y el inyector transversal (25 cm) eran iguales para todos los canales. Las longitudes de separación (distancia entre la intersección y la ventana de excitación/detección) para cada uno de los canales oscilan entre 16 y 20 cm de longitud. Se ajustó el área en sección transversal de los canales entre el pocillo de cátodo y el inyector de forma que todas las resistencias y por tanto los campos eléctricos entre el cátodo y la intersección son esencialmente iguales con polarización. Esto garantizó que los campos eléctricos experimentados por las muestras eran idénticos independientemente del canal de separación dentro del cual se cargó una muestra. Los voltajes de intersección para todos los canales eran esencialmente idénticos. Las ramas de entrada de muestra y de desecho de muestra para la inyección de muestras tenían ambas 2,5 mm de longitud. La desviación entre ambos canales era de 500 μm .

Ejemplo 1B: *fabricación de chip y de soporte*

Se aplicó un patrón en el chip por estampado en caliente, perforación para formar orificios de acceso y unión por difusión para sellar los canales. Se fabricó el modelo maestro en vidrio por fotolitografía, usando un procedimiento de grabado en húmedo químico. Después se usó este modelo maestro en vidrio para fabricar una herramienta de estampado de níquel-cobalto por electroconformación para generar una réplica en negativo del modelo maestro de vidrio. Se usaron láminas de película de Zenor™-1420R (5" x 2" de tamaño y 188 μm de grosor) como material de sustrato. En estas láminas, se formaron por perforación orificios de acceso de cátodo, de ánodo, de muestra y de desecho. Esto se siguió por estampado en caliente de las características de diseño del chip en el instrumento de estampado al sustrato. Se llevó a cabo el estampado situando el apilamiento según se ilustra en la figura 7 en una prensa hidráulica calentada durante 15 minutos a 135°C y 1250 psi de presión de compresión. Se mantuvo el apilamiento a 1250 psi de presión de compresión y se dejó enfriar hasta 38°C antes de la liberación. La fabricación de este chip con polímeros termoplásticos finos que contienen monómeros de norborneno dio como resultado una baja fluorescencia de fondo en la ventana de excitación y detección. Lograr una unión por difusión de fuerza de unión alta permitió el uso de matrices de cribado de viscosidad alta.

Se logró la unión por difusión del sustrato alineando una lámina de película de Zenor™-1420R (5" x 2" de tamaño y 188 μm de grosor) sobre el sustrato y sometiendo ese apilamiento a calor y presión. No se aplicó ningún adhesivo entre las láminas de película; se llevó a cabo la unión completamente por calor y presión. El grosor final del chip fue de aproximadamente 376 μm . Se sometieron a prueba chips de separación fabricados por este método y demostraron poder resistir al menos 830 psi de presión antes de la rotura.

La figura 8 ilustra un soporte de chip que se fabricó por fresado de CNC a partir de una lámina acrílica de 3/8" de grosor (GE Plastic). El soporte de chip consistía en tres secciones principales: la placa de cátodo, la parte central y la placa de ánodo. La placa de cátodo contenía el pocillo de cátodo, los pocillos de muestra y de desecho y orificios de alineamiento. La placa de ánodo contenía el pocillo de ánodo y orificios de alineamiento. Tanto la placa de cátodo como la placa de ánodo tenían 3/8" de grosor para proporcionar suficiente volumen de muestra para la inyección de muestra y volumen de tampón para electroforesis. La parte central tenía 0,04" de grosor y tenía una abertura como "ventana de detección" para la detección de fluorescencia inducida por láser en los microcanales. Con esta configuración, la autofluorescencia a partir del chip de separación llega a estar dominada por el sustrato de aproximadamente 376 μm de grosor. Se unió el chip de separación al soporte de chip con adhesivo sensible a la presión de doble cara. Se seleccionó el adhesivo para ser inerte con respecto a los tampones de separación y matrices de cribado. Se unieron el soporte y el chip de separación con resina epoxídica sensible a presión. Se minimizó el grosor del plástico en la zona de excitación y detección fabricando un recorte en el portador en esta región.

El espectro de emisión óptica de Zenor™-1420R tiene el pico de emisión de Raman a 570 nm que tiene una detección de fluorescencia limitada con colorantes fluorescentes. La figura 9 demuestra la baja autofluorescencia del chip de plástico (PChip1 y PChip2) en comparación con chips de separación de vidrio típicos (vidrio de 1,4 mm y vidrio de 0,7 mm). Se logró la baja autofluorescencia del chip de plástico seleccionado un polímero COP y minimizando el grosor del dispositivo en la zona de detección y fabricando el dispositivo con películas finas.

Ejemplo 1C: *modificación de superficie y matriz de cribado*

Se llevó a cabo la modificación de superficie pre-tratando inicialmente las superficies de los microcanales con agua desionizada, seguido por NaOH 1 M. Se aplicó una purga de nitrógeno para eliminar fluidos de los canales. El

tratamiento de la superficie se siguió por hacer fluir una disolución de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 0,1% (p/v) a través de los canales seguido por incubación durante la noche a temperatura ambiente. Se usó nitrógeno de alta pureza para purgar a través de los canales para eliminar fluidos dentro del canal.

5 La matriz de cribado usada para estos experimentos fue poliacrilamida lineal (LPA) al 4% en urea 7 M y tampón 1X TTE (Amresco).

Ejemplo 1D: *dimensionamiento de STR por electroforesis*

Se llevó a cabo la separación electroforética y el análisis de ácidos nucleicos en el dispositivo Genebench-FX™ serie 100 (Network Biosystems, Inc., Wobum, MA). Se configuró este instrumento para aceptar el chip de separación de plástico y el soporte de chip para permitir un buen acoplamiento óptico, eléctrico y térmico entre el chip y el instrumento. La temperatura de la cámara se mantuvo a 50°C durante toda la operación.

10 Para experimentos de dimensionamiento de ADN se amplificó ADN genómico humano con el kit ABI AmpFISTR (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Se mezcló el producto de PCR (2,7 µl) con 0,3 µl de patrón de dimensionamiento y 10 µl de formamida, y se cargó dentro de los pocillos de muestra para análisis. El ensayo consistió en pre-electroforesis llevada a cabo a 156 V/cm durante 6 minutos antes de la introducción de muestras aplicando una diferencia de potencial de 3900 V en el pocillo de ánodo y conectando a tierra el pocillo de cátodo. Se introdujeron muestras de ADN aplicando un campo eléctrico de 350 V/cm durante 18 segundos, seguido por una carga doble de 1,2 minutos aplicando un campo eléctrico de 350 V/cm a través de los pocillos de muestra y de desecho y aplicando simultáneamente un campo eléctrico de 15,6 V/cm a través de los pocillos de cátodo y de ánodo. Tras la inyección de muestra, se llevó a cabo la separación de ADN electroforética aplicando un campo eléctrico de 156 V/cm a través del pocillo de cátodo y de ánodo mientras se mantenía un voltaje de retroceso de 800 V durante 40 minutos.

20 Para experimentos de secuenciación de ADN, se sometió a secuenciación cíclica plásmido M13 con el kit de secuenciación cíclica de terminador de colorante GE Amersham DYEnamic™ ET (GE Healthcare), se precipitó en etanol y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada. El ensayo de separación consistió en una pre-electroforesis llevada a cabo a 156 V/cm durante 6 minutos antes de la introducción de muestras aplicando una diferencia de potencial de 3900 V en el pocillo de ánodo y conectando a tierra el pocillo de cátodo. Se introdujo la muestra de ADN aplicando un campo eléctrico de 350 V/cm durante 60 segundos. Tras la inyección de muestra, se llevó a cabo la separación de ADN electroforética aplicando un campo eléctrico de 156 V/cm a través del pocillo de cátodo y de ánodo mientras se mantenía un voltaje de retroceso de 400 V durante 60 minutos. Se calculó la resolución de separación de ADN extrayendo la información de picos (separación de picos y anchura de picos) a partir de Peakfit®.

25 Se llevó a cabo la separación satisfactoria simultáneamente en 16 carriles en el chip de plástico. La figura 10 muestra el perfil denominado de alelos por la escalera alélica a partir de un kit marcado de 5 colores (kit ABI AmpFISTR Identifier). Estos resultados demostraron que los dispositivos de la invención podían separar con 5 colores en un chip de plástico y resolver claramente alelos incluyendo los que están separados por una distancia equivalente a tan sólo un único par de bases (THO 1, alelos 9.3 y 10). La figura 11 muestra un perfil de STR denominado de alelos para ADN genómico humano 9947A, mostrando que se logró un perfil completo a 1,0 ng de molde de ADN. La figura 12 muestra la resolución con $R > 0,4$ para hasta 480 pb, demostrando resolución de una única base hasta 480 pb. La figura 13 ilustra esta resolución mostrando que 2 alelos que están separados por 1 nucleótido pueden resolverse claramente sin ninguna ambigüedad. Las figuras 14 y 15 muestran un perfil de secuenciación de ADN que demuestra una resolución de un único par de bases.

Ejemplo 2

Chip de plástico de inyección electrocinética

Ejemplo 2A: diseño de chip

45 Otra configuración de los chips de separación electroforética de la invención usa un único canal para la separación. Se introduce cada muestra se introduce dentro de un canal de separación por inyección de muestras electrocinética. Este enfoque alternativo permite el uso de volúmenes de muestra pequeños y una simplificación significativa en el procedimiento de separación. Se muestra un diagrama esquemático de diseño de chip para inyección de muestras electrocinética en una vista de descomposición en la figura 16, que muestra las secciones de soporte y de chip de separación. El dispositivo consiste en 16 microcanales que tienen efectivamente 20 cm de longitud de separación. Cada canal tiene un orificio de acceso en cada extremo. Los canales tienen 90 µm de anchura y 40 µm de profundidad.

Ejemplo 2B: fabricación de dispositivo

55 Se fabrica el dispositivo de la figura 16 siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior. En resumen, se forman orificios de acceso (1 mm de diámetro) en una película de COP (Zeonor™-1420R) con un grosor de 188 µm. Después se forman patrones de canal (anchura de 90 µm y profundidad de 40 µm) por estampado en caliente. Se une por difusión un revestimiento de COP (Zeonor™-1420R) al sustrato para sellar los canales.

Ejemplo 2C: *electroforesis*

El dispositivo se prepara por separación aplicando una modificación de superficie a los canales según se describió en la sección anterior. Esto va seguido por rellenar los canales con una matriz de cribado. Se cargan muestras dentro del depósito de muestra/de cátodo. Se aplica un campo de inyección a través de los electrodos a la muestra para inyectar ADN cargado negativamente dentro del canal de separación. Tras la inyección de ADN en los canales, se añade tampón (1X TTE; Ameresco) al depósito de muestra/de cátodo a un volumen 10 veces el volumen de la muestra. Se aplica un campo eléctrico a través del cátodo y el ánodo para separar el ADN del conector de inyección por el canal de separación. La adición sirve para diluir la muestra que está en la muestra/cátodo y no hay ninguna necesidad de eliminar la muestra antes de cargar el tampón. Se lleva a cabo la separación y detección en un instrumento Genebench-FX™ serie 100 y se lleva a cabo análisis de datos con el software descrito en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 3

Secuenciación de ADN

Para el análisis de secuenciación de ADN, se amplifica molde de ADN en una mezcla de reacción que consiste en enzima de PCR SpeedSTAR HS (Takara, Madison, WI) (U/μl): 0,025, tampón rápido 1: 1x, dNTP: 0,25 mM, cebador (directo): 250 nM y cebador (inverso): 250 nM. Se añade a la mezcla un nivel deseado de ADN de molde. Se añade agua DI o tampón TE (Tris 10 mM o EDTA 0,1 mM) a la mezcla de reacción hasta un volumen total de 10 μl. La ciclación térmica de la mezcla de reacción de PCR, siguiendo protocolos recomendados por el fabricante, consiste en activación de inicio en caliente de 60 segundos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión (5 segundos a 98°C, 10-15 segundos a 55°C y 5-10 segundos/kpb a 72°C) y una extensión final de 60 segundos a 72°C.

Se limpia el producto de PCR completo usando un filtro 30K MWCO UF (Pall, East Hills, NY), siguiendo el protocolo del fabricante. El producto limpiado, que consiste en ADN en agua DI, o bien se diluye o bien se aplica en su totalidad como molde para la reacción de secuenciación.

Se llevó a cabo la secuenciación cíclica de molde de PCR usando el kit de secuenciación cíclica de terminador DYEnamic™ ET (GE Amersham Biosciences) a reacción de intensidad media con la siguiente mezcla de reacción. Premezcla de secuenciación: 4 μl, tampón de dilución: 4 μl, cebador (10 μM): 5 pmol. Se añadió molde de ADN a la mezcla de reacción de secuenciación. Se añadió agua DI a la mezcla de reacción hasta un volumen total de 20 μl. Siguiendo protocolos de ciclación recomendados por el fabricante la condición de ciclación usada consiste en treinta ciclos de (20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C, 60 segundos a 60°C).

Se limpia la mezcla de reacción de secuenciación por precipitación en etanol. Se resuspende el producto precipitado en 13 μl de agua DI y se usa como muestra para separación y detección.

Para el análisis de STR, se lleva a cabo la amplificación en reacciones de 10 μl con la siguiente mezcla de reacción que consiste en: enzima de PCR SpeedSTAR HS (Takara, Madison, WI) (U/μl): 0,0315, tampón rápido 1: 1x, conjunto de cebadores: 2 μl, tampón rápido 1: 1X, dNTP: 200 μM, cebador (directo/inverso): 2 μl de AmpFISTR Profiler™, COFiler™ o Identifiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El protocolo de ciclación sigue las condiciones de los fabricantes de enzimas que consisten en una activación de inicio en caliente de 60 segundos a 95°C seguida por 28 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión (4 segundos a 98°C, 15 segundos a 59°C, 5 segundos a 72°C) y una extensión final de 60 segundos a 72°C. El producto de PCR se usa como muestra para la separación y detección. Alternativamente, el producto de PCR también puede purificarse y usarse como muestra para la separación y detección.

Debe entenderse que la divulgación anterior enfatiza ciertas realizaciones específicas de la invención y que todas las modificaciones o alternativas equivalentes a las mismas están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45

REIVINDICACIONES

1. Aparato que comprende:
 un chip de separación electroforética (250) que tiene
 una capa de sustrato (360) y
 5 una capa de revestimiento (370)
 en el que la capa de sustrato incluye una pluralidad de ranuras y una de la capa de sustrato y la capa de revestimiento incluye una serie de orificios pasantes;
 en el que una superficie superior de la capa de sustrato y una superficie inferior de la capa de revestimiento
 10 están unidas entre sí para formar una pluralidad de canales microfluídicos, teniendo dichos canales una región de detección en los extremos terminales de una región de separación;
 en el que cada una de la capa de sustrato y la capa de revestimiento comprende una película de plástico fina de polietileno, un poliacrilato, un policarbonato, un polímero de olefina cíclica (COP) insaturado, parcialmente insaturado o saturado, un copolímero de olefina cíclica (COC) insaturado, parcialmente
 15 insaturado o saturado, o un termopolímero de norborneno, que esencialmente no emite luz por fluorescencia que tiene una longitud de onda de entre 500 y 800 nm cuando se excita a una longitud de onda de entre aproximadamente 450 y 500 nm, y
 en el que cada una de la capa de sustrato y la capa de revestimiento tiene independientemente un grosor de menos de 200 μm ;
 y un soporte de plástico (201) unido fijamente al chip, teniendo dicho soporte
 20 una parte de ánodo (202) con al menos un pocillo de ánodo (206),
 una parte de cátodo (203) con al menos un pocillo de cátodo (207) y
 una parte central (204) entre las mismas, teniendo la parte central una ventana de detección (205) fabricada a partir de un recorte en el soporte de plástico que se solapa con la región de detección de cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos de tal forma que el grosor total de plástico en la región de
 25 detección es menor de 400 μm .
2. Aparato según la reivindicación 1, en el que la película de plástico fina es un termopolímero de norborneno.
3. Aparato según la reivindicación 1, en el que la película de plástico fina del chip es un polímero de olefina cíclica (COP) insaturado, parcialmente insaturado o saturado.
4. Aparato según la reivindicación 1, en el que el soporte de plástico comprende polietileno, un poliacrilato, un policarbonato, un polímero de olefina cíclica (COP) insaturado, parcialmente insaturado o saturado, un copolímero de olefina cíclica (COC) insaturado, parcialmente insaturado o saturado, o un termopolímero de
 30 norborneno.
5. Aparato según la reivindicación 3, en el que el soporte de plástico está hecho de una lámina acrílica.
6. Aparato según la reivindicación 1, en el que la región de detección de cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos está sustancialmente en la misma ubicación a lo largo de cada canal de manera que la ventana de detección está en una única ubicación en la parte central del soporte.
7. Aparato según la reivindicación 1, en el que cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos tiene una longitud de separación de desde 2 cm hasta 50 cm.
8. Aparato según la reivindicación 1, en el que cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos comprende además un canal de inyección.
9. Aparato según la reivindicación 3, en el que el plástico fino esencialmente no emite luz por fluorescencia que tiene una longitud de onda de 570 nm.
10. Aparato según la reivindicación 1, en el que una pluralidad de especies de ácidos nucleicos en una muestra de ácido nucleico generada para aplicaciones de dimensionamiento de fragmentos puede detectarse con una relación señal/ruido de más de 3 empezando con una única copia de un molde de ácido nucleico para
 45 amplificación por PCR.
11. Aparato según la reivindicación 1, en el que una pluralidad de especies de ácidos nucleicos en una muestra de ácidos nucleicos generada para aplicación de secuenciación de ADN puede detectarse con una relación

señal/ruido de más de 3 empezando con una única copia de un molde de ADN para amplificación por PCR.

- 5 12. Aparato según la reivindicación 1, en el que cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos comprende además un recubrimiento de superficie, preferiblemente en el que el recubrimiento de superficie es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMA), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), polidimetilacrilamida (PDMA), polivinilpirrolidinona, dimetilacrilamida (DMA), dietilacrilamida DEA, polidietilacrilamida y mezcla de los mismos.
- 10 13. Aparato según la reivindicación 1, en el que cada uno de la pluralidad de canales microfluídicos comprende además una matriz de cribado, preferiblemente en el que la matriz de cribado comprende una poli(N,N-dialquilacrilamida) lineal o reticulada, poliacrilamida lineal, polidimetilacrilamida, polivinilpirrolidinona o combinaciones de las mismas, más preferiblemente en el que la matriz de cribado comprende poliacrilamida al 1-50% en peso.
14. Aparato según la reivindicación 1, que comprende además una capa porosa entre cada pocillo de cátodo y cada canal microfluídico, en el que la capa porosa puede bloquear sustancialmente el paso de burbujas de gas desde los pocillos de cátodo al interior de cada canal microfluídico.
- 15 15. Aparato según la reivindicación 14, en el que la capa porosa comprende una frita de vidrio, una frita polimérica, una membrana polimérica o un filtro polimérico.

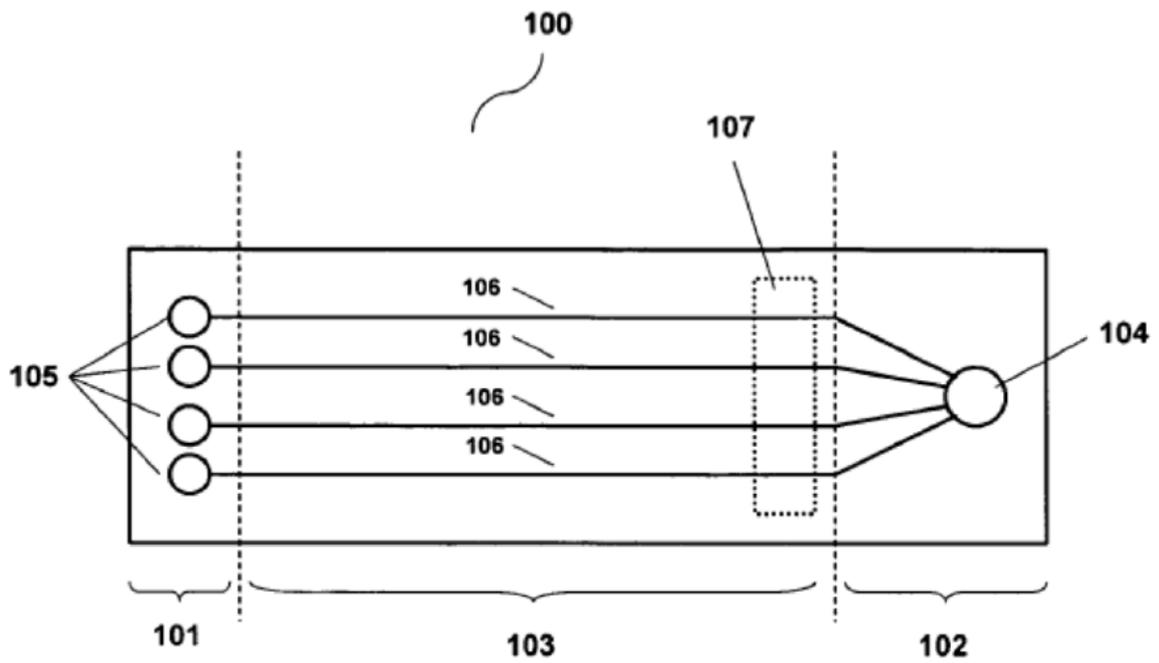


Figura 1

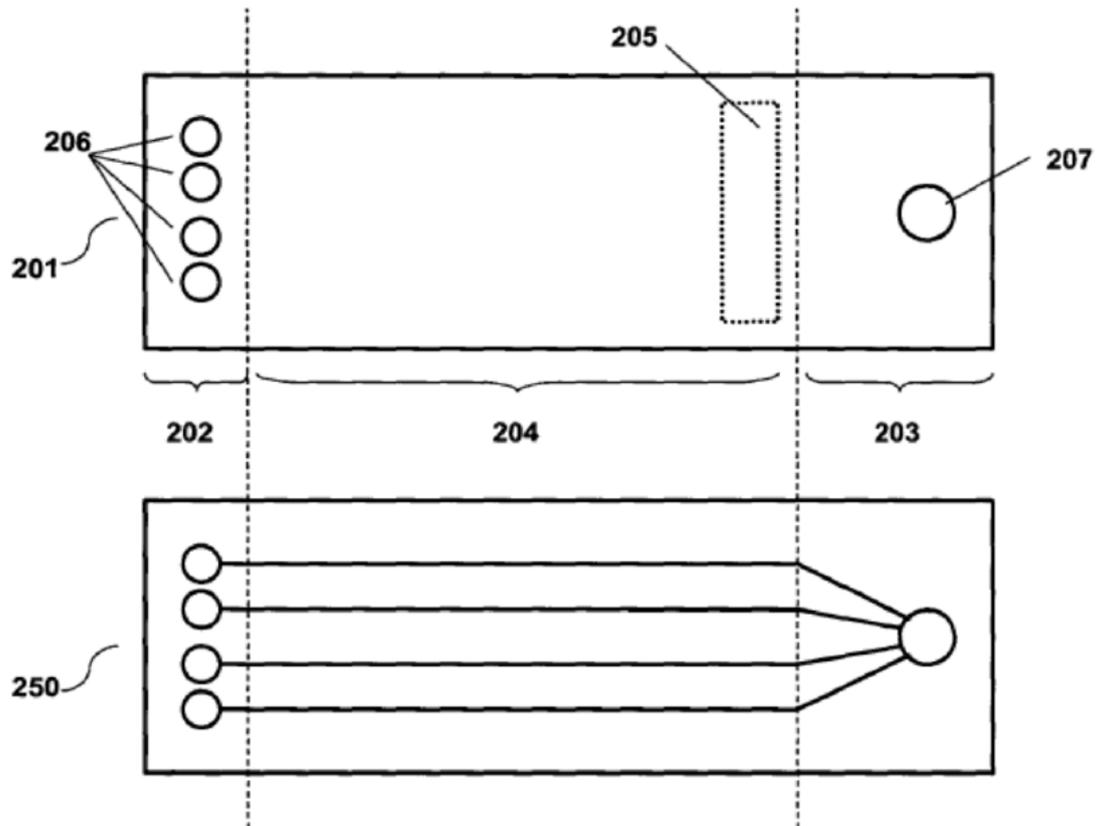


Figura 2

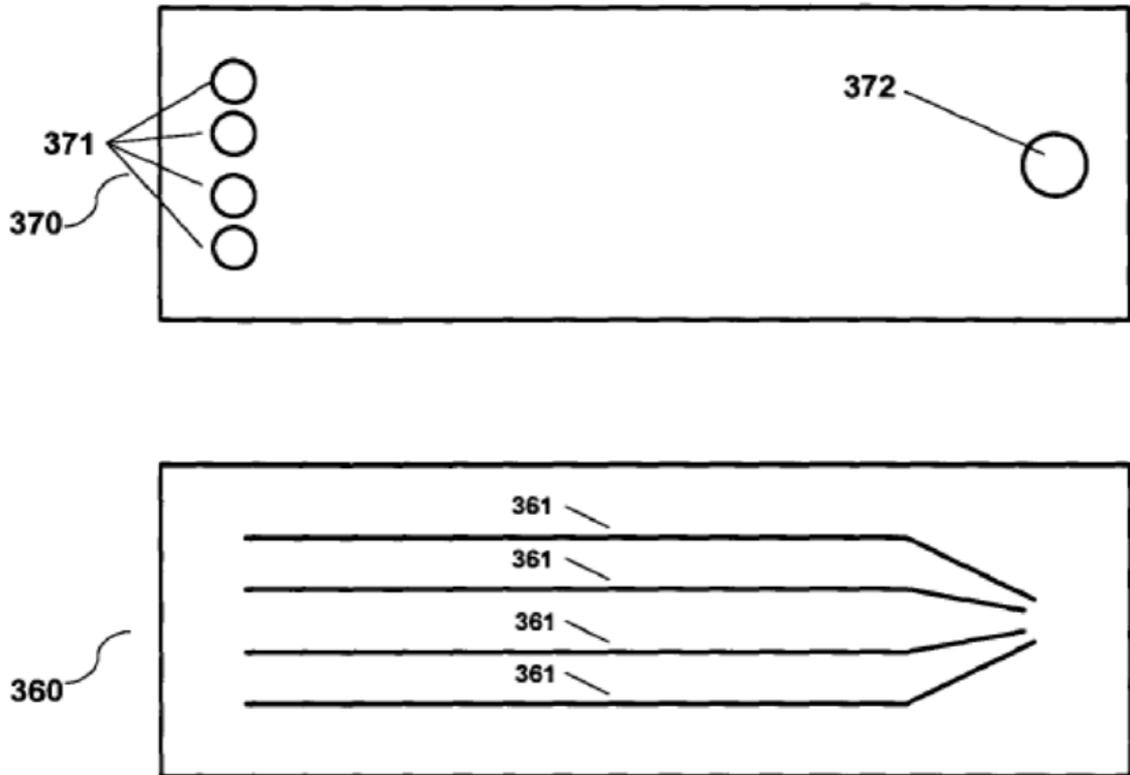


Figura 3

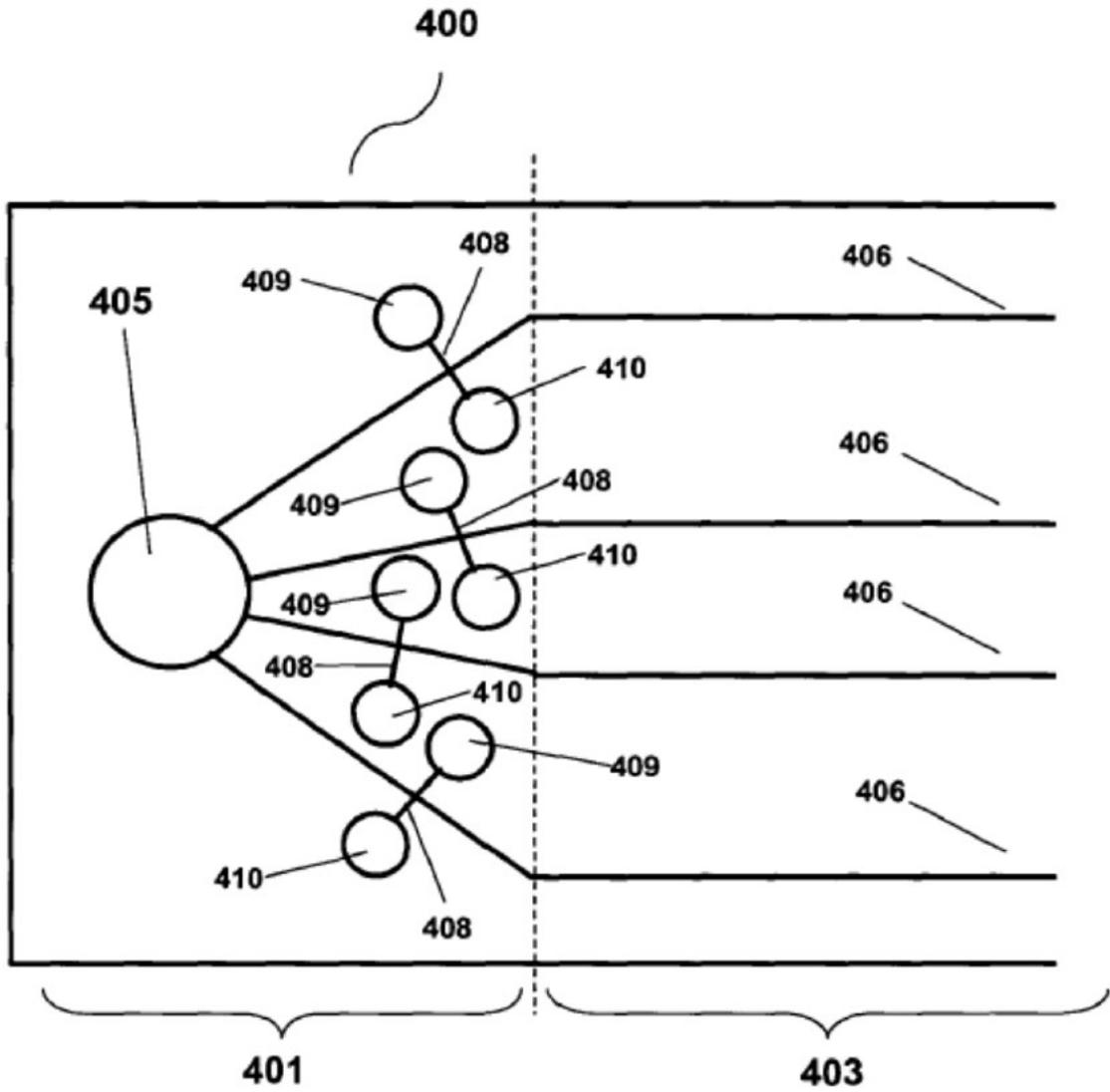


Figura 4

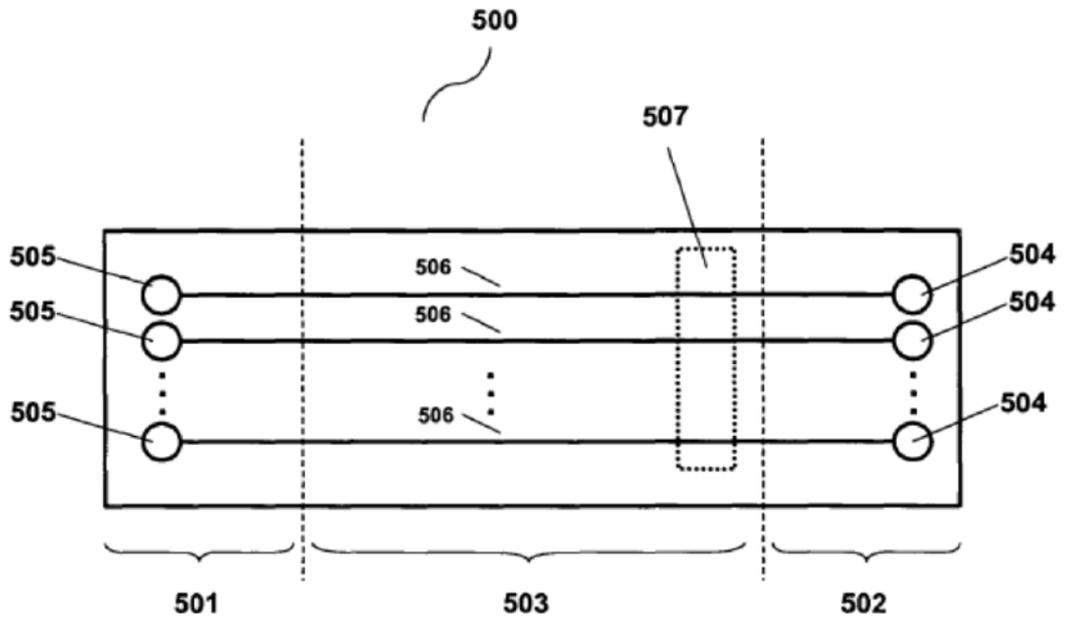


Figura 5

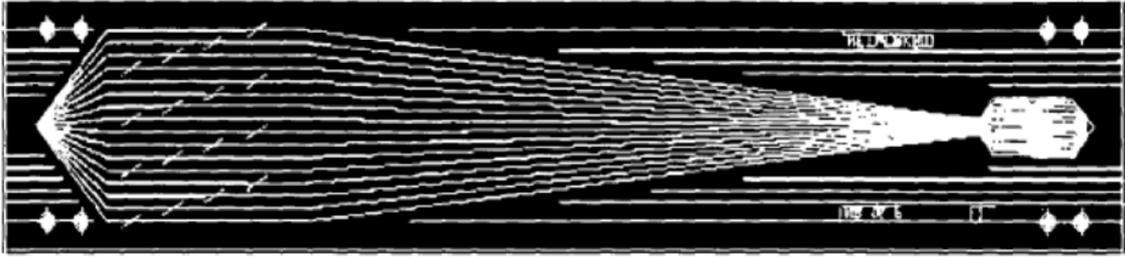


Figura 6

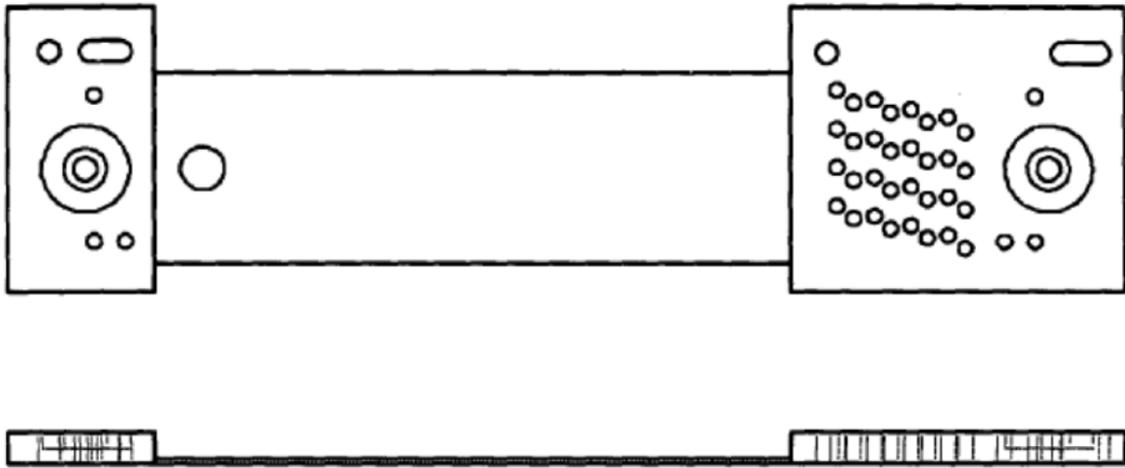


Figura 8

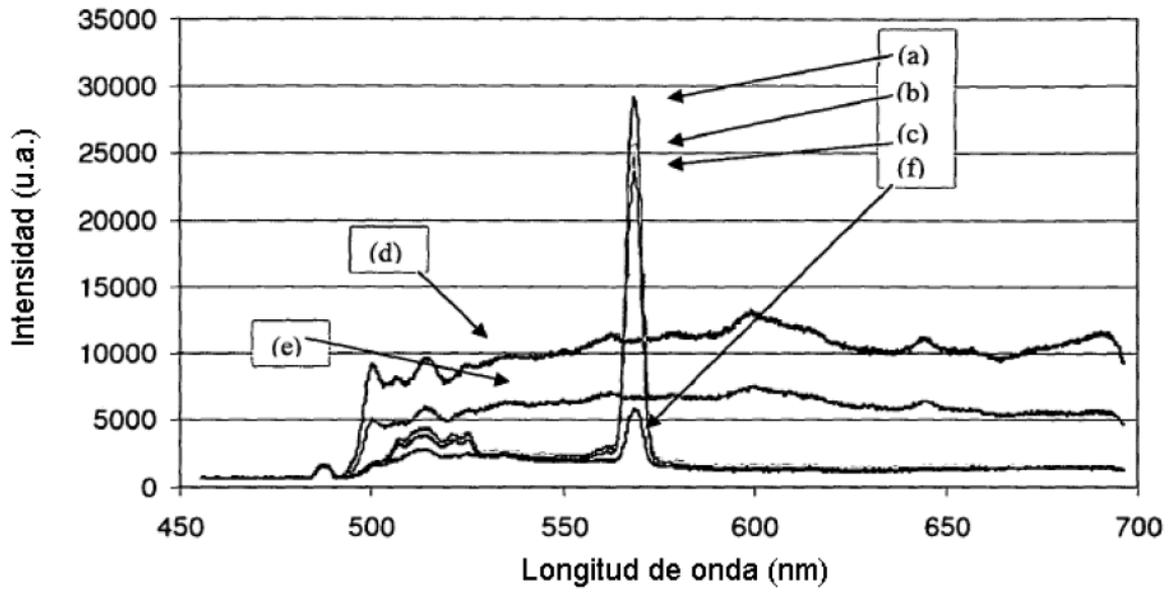


Figura 9

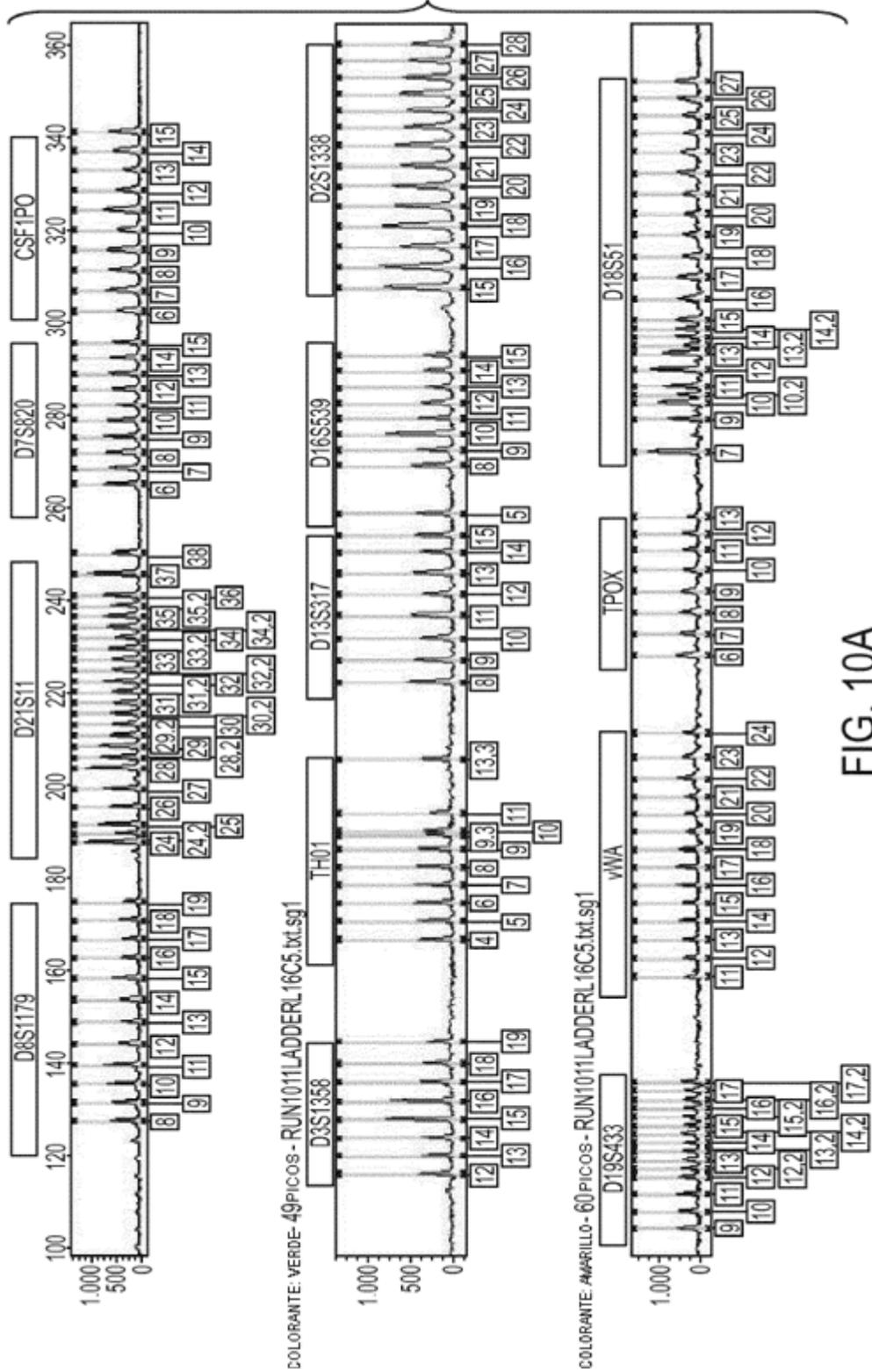


FIG. 10A

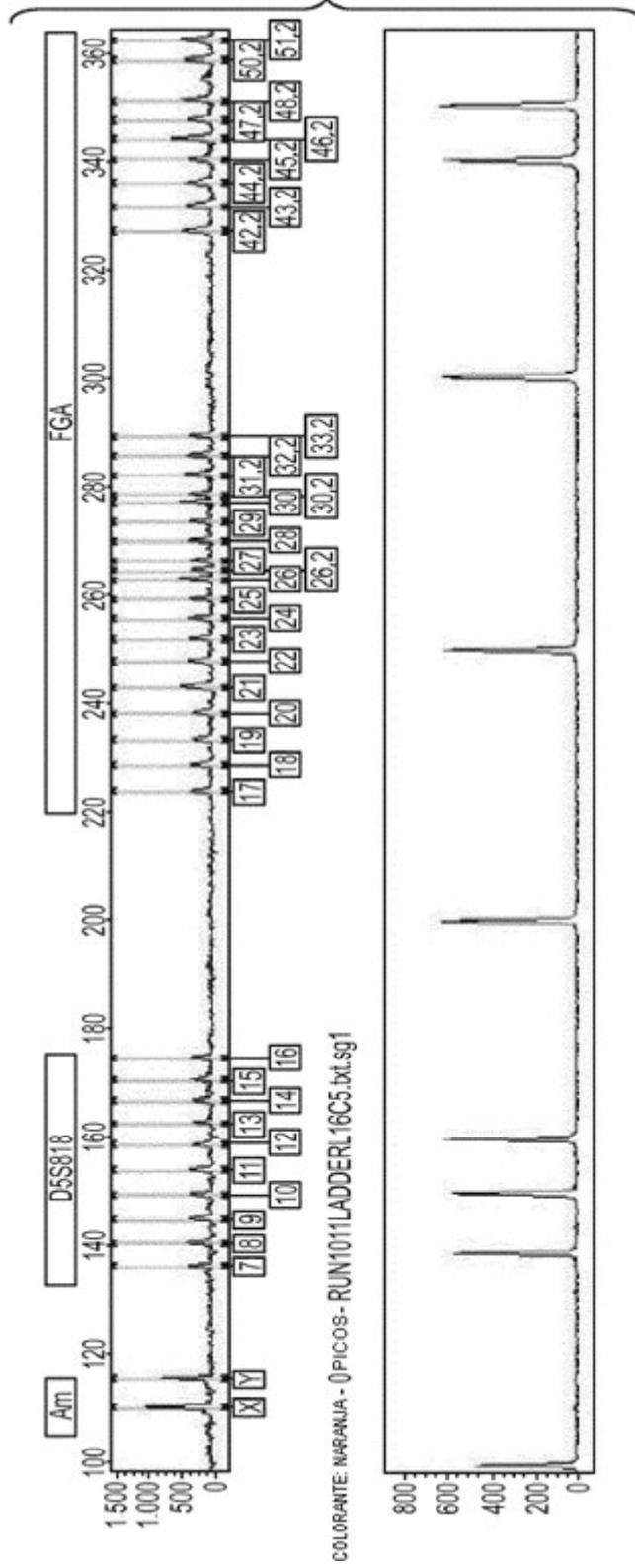


FIG. 10B

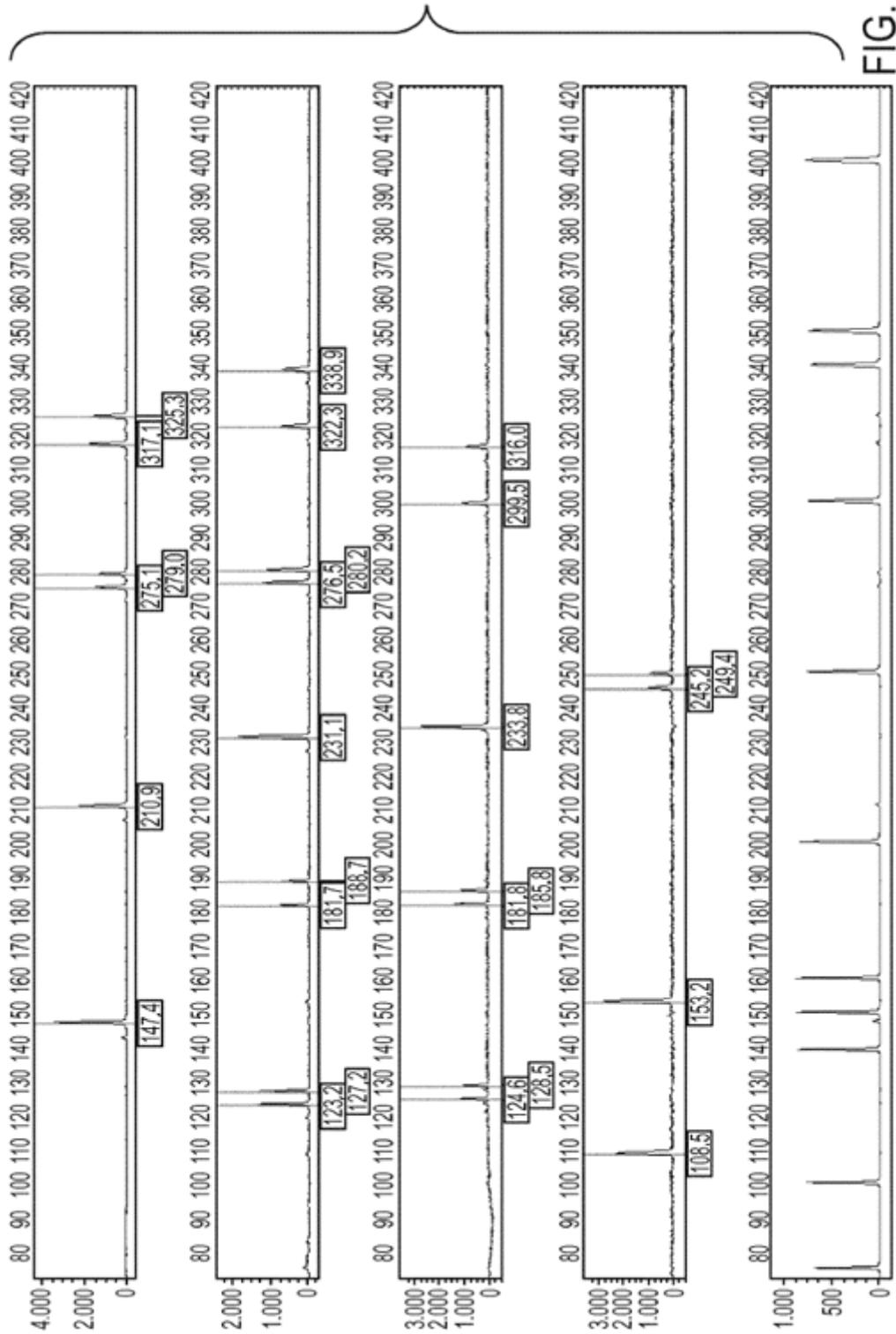
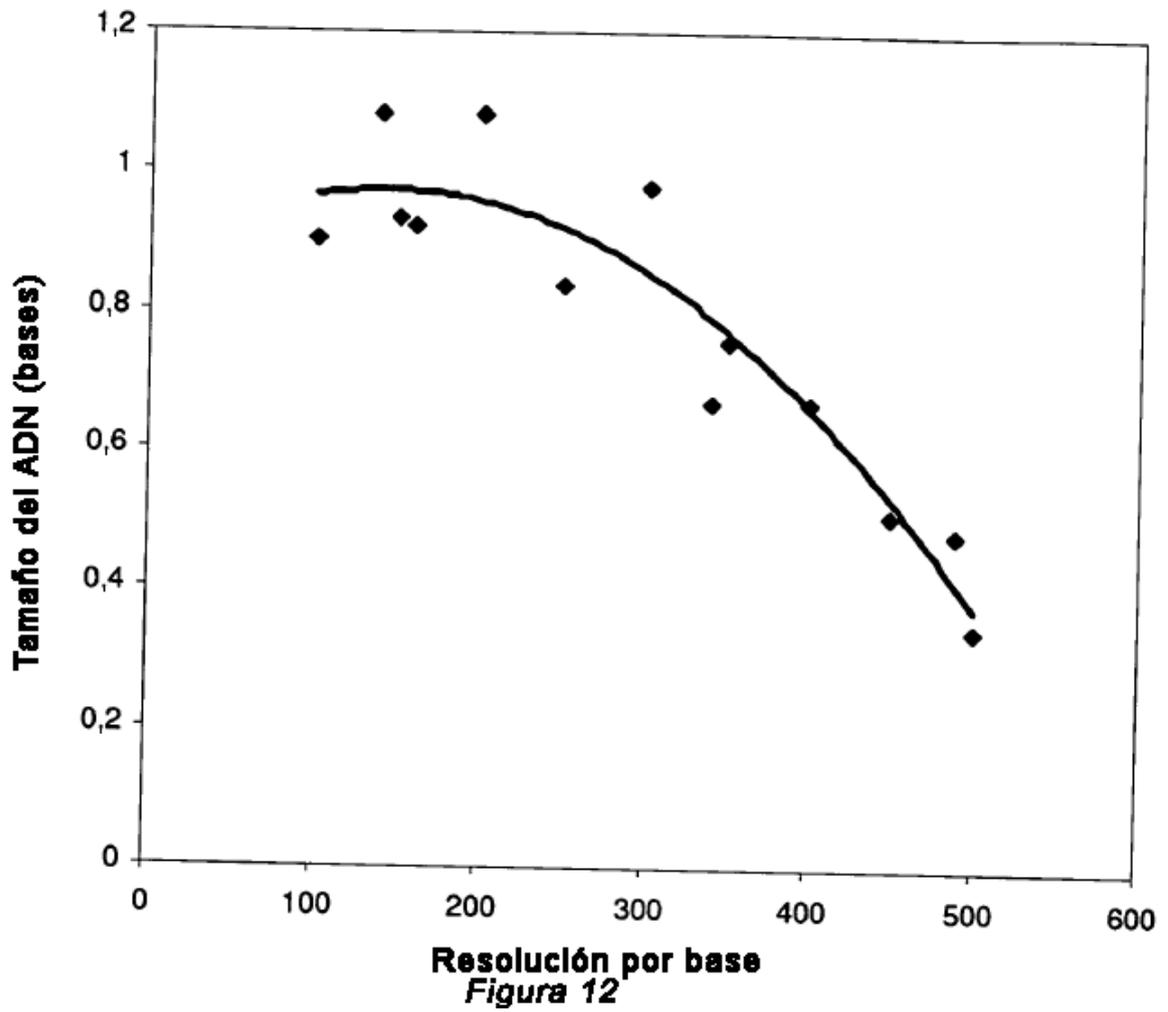


FIG. 11



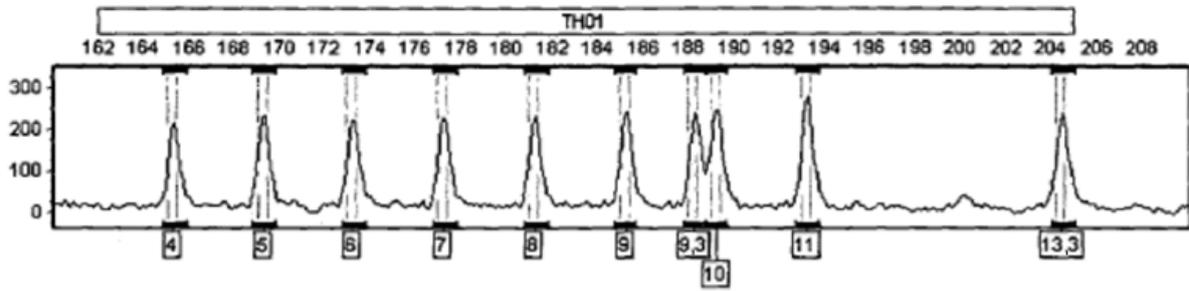


Figura 13

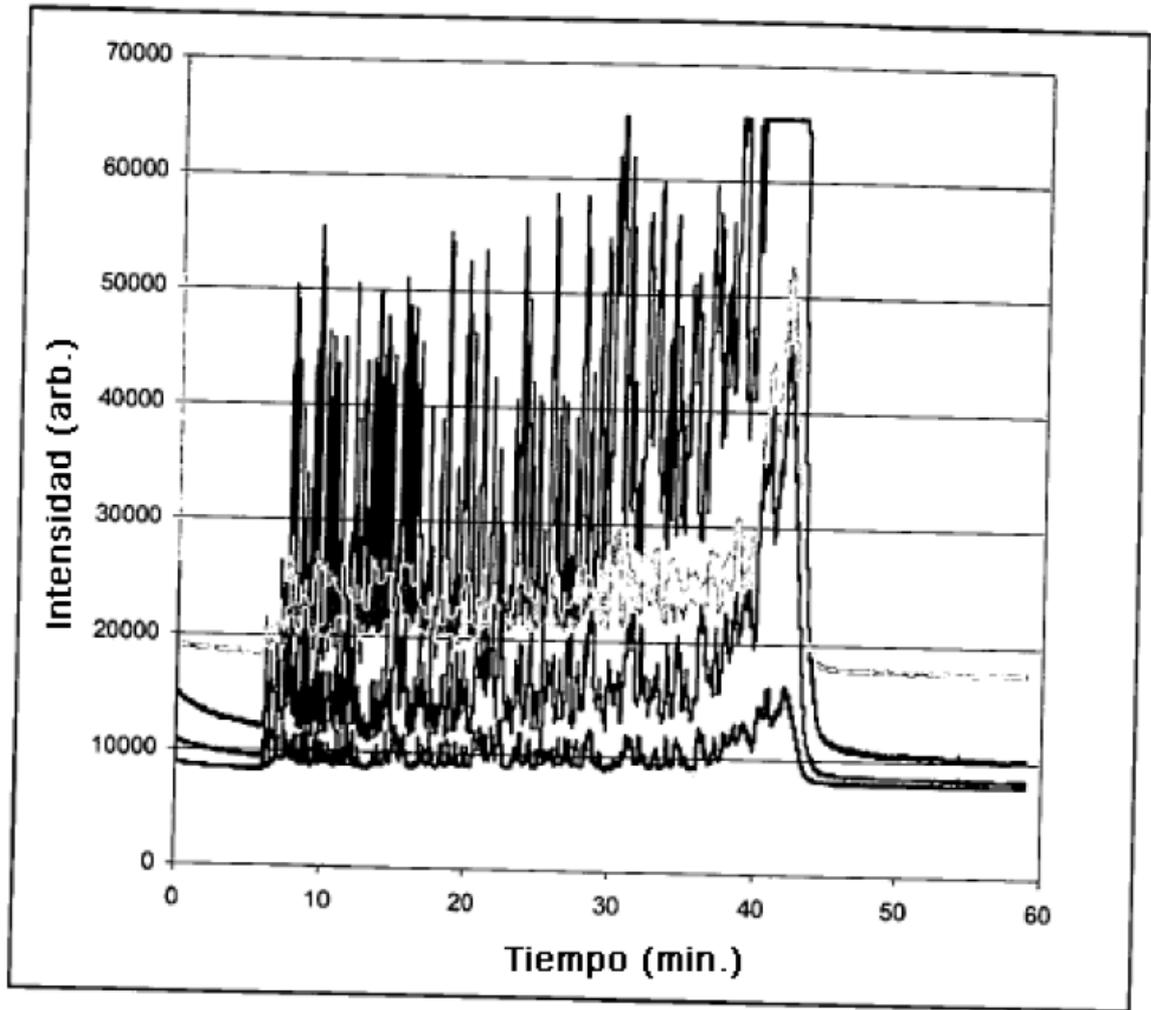


Figura 14

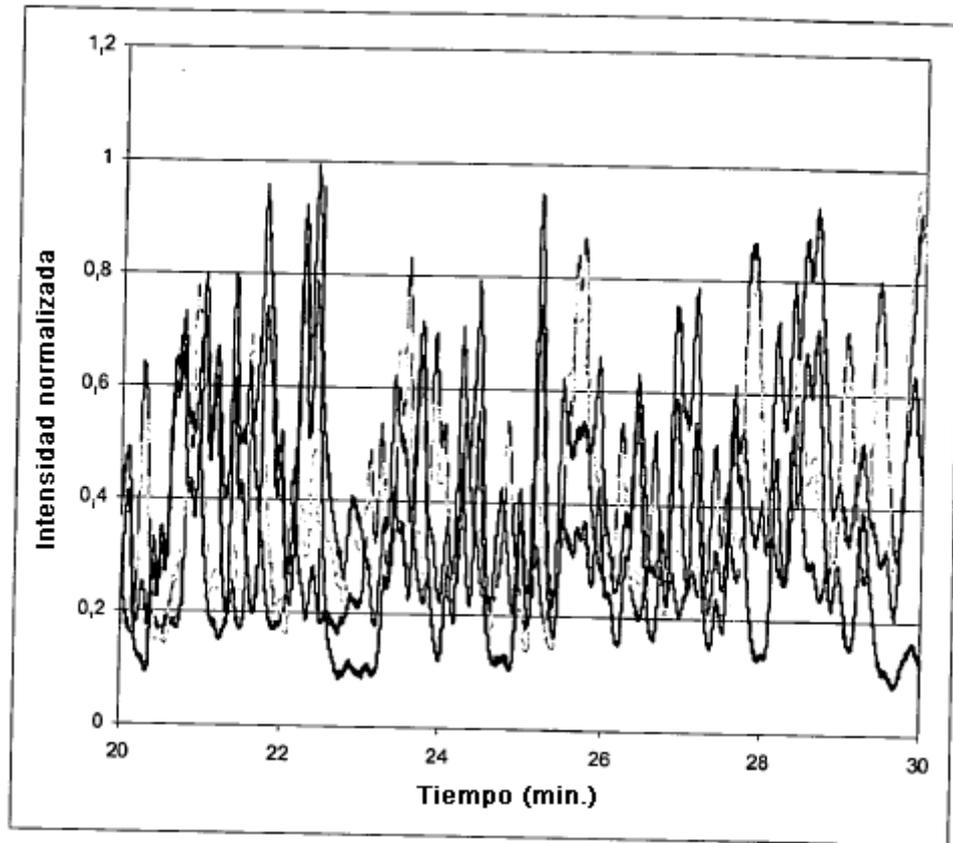


Figura 15

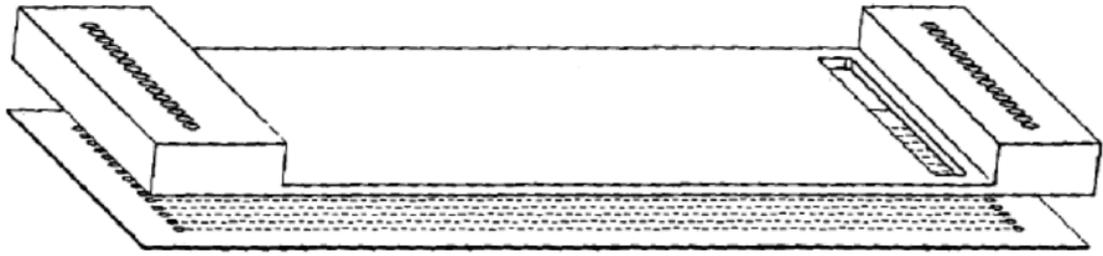


Figura 16