

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 934**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013** **E 17206000 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3327143**

54 Título: **Método de secuenciación**

30 Prioridad:

**04.10.2012 GB 201217772**

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

**03.12.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRAYLING, CAMERON ALEXANDER;  
BALMFORTH, BARNABY;  
SOARES, BRUNO FLAVIO NOGUEIRA DE  
SOUSA;  
ISAAC, THOMAS HENRY;  
BREINER, BORIS;  
NATALE, ALESSANDRA y  
AMASIO, MICHELE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 733 934 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Método de secuenciación

5 La presente invención se refiere a un dispositivo microfluído adecuado para su uso en un método para determinar la secuencia de bases de nucleótidos en polinucleótidos derivados, por ejemplo, de ADN o ARN de origen natural.

10 La secuenciación de material genético de la próxima generación ya está teniendo un impacto significativo en las ciencias biológicas en general y en la medicina en particular a medida que el coste unitario de la secuenciación está en consonancia con la llegada al mercado de máquinas de secuenciación cada vez más rápidas. Por ejemplo, la solicitud de patente WO 2009/030953 pendiente junto con la presente describe un nuevo secuenciador rápido en el que, entre otras cosas, la secuencia de bases de nucleótidos o pares de bases en una muestra de polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios (por ejemplo, ARN o ADN de origen natural) se lee por la translocación de la misma a través de un sustrato nanoporoso dotado de nanoestructuras plasmónicas yuxtapuestas dentro o adyacentes a la salida de los nanoporos. En este dispositivo, las nanoestructuras plasmónicas definen ventanas de detección (esencialmente un campo electromagnético) dentro de las cuales cada base de nucleótidos (opcionalmente etiquetada) se induce a su vez a fluorescencia o fotones de dispersión Raman de una manera característica mediante la interacción con la luz incidente. Los fotones así generados se detectan entonces de forma remota, se multiplexan y se convierten en una corriente de datos cuyo contenido de información es característico de la secuencia de bases de nucleótidos asociada con el polinucleótido. Esta secuencia puede entonces recuperarse de la corriente de datos utilizando algoritmos computacionales incorporados en el software correspondiente programado en un microprocesador integrado con el mismo o en un dispositivo informático auxiliar conectado al mismo.

25 Otro aparato para polinucleótidos de secuenciación rápida se describe, por ejemplo, en los documentos US 6627067, US 6267872 y US 6746594. En su forma más simple, este dispositivo emplea electrodos, en lugar de nanoestructuras plasmónicas, para definir la ventana de detección a través del sustrato o alrededor de la salida del nanoporo. Después, se aplica una diferencia de potencial a través de los electrodos y los cambios en una propiedad eléctrica del medio iónico que fluye entre los mismos, como consecuencia de la translocación electroforética del polinucleótido y el electrolito asociado a través del nanoporo, se mide en función del tiempo. En este dispositivo, a medida que las diversas bases de nucleótidos individuales pasan a través de la ventana de detección, lo bloquean y desbloquean continuamente, lo que provoca "eventos de bloqueo" que dan lugar a fluctuaciones características en el flujo de corriente o la resistividad. Estas fluctuaciones se utilizan entonces para generar una corriente de datos adecuada para el análisis como se describe anteriormente.

35 La generación de corrientes de gotículas estables, especialmente corrientes de microgotas, es otra área de desarrollo de la tecnología que ya tiene aplicaciones en biología molecular. Por ejemplo, el documento US7708949 describe un nuevo método microfluído para generar gotículas de agua estables en aceite, mientras que, por ejemplo, el documento US2011/0250597 describe la utilización de esta tecnología para generar microgotas que contienen una plantilla de ácido nucleico (típicamente un fragmento de ADN o ARN polinucleotídico) y una pluralidad de pares de cebadores que permiten amplificar la plantilla utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Otras solicitudes de patente relacionadas con este enfoque y con el campo generalmente incluyen los documentos US 2010/184020, US2012/0164633, US2012/0122714, US2011/0000560, US2010/01376163, US2010/0022414 y US2008/0003142. J. Molecular Diagnostics 14(3) 233-246 (2012) describe el uso de este método de PCR con microgotas para identificar las mutaciones genéticas asociadas con la distrofia muscular congénita.

45 El documento US5674743A describe un método y un aparato para la secuenciación automatizada de ADN. El aparato descrito incluye una estación de escisión para la extracción de ADN de las células y la separación de nucleótidos individuales del ADN, así como una estación de detección para la irradiación, detección e identificación de los nucleótidos individuales. Los nucleótidos se detectan irradiando los nucleótidos con un láser para estimular su fluorescencia natural.

50 El documento WO 2003/080861 A1 describe un proceso para secuenciar ácidos nucleicos en el que la molécula de ácido nucleico a secuenciar se degrada secuencialmente en presencia de un reactivo marcado con fluorescencia en el que se forma un nucleósido marcado con fluorescencia que tiene características de fluorescencia específicas de nucleobase.

55 Schaerli & Hollfelder (2009) Molecular Biosystems, 5(12), 1392-1404, es una revisión de la compartimentación *in vitro* de reacciones en gotículas de agua en aceite para aplicaciones en diagnóstico, celómica, proteómica, descubrimiento de fármacos y sistemas y biología sintética.

60 El documento WO 2007/133710 A2 describe sustratos microfluídos y métodos para realizar ensayos biológicos, químicos y de diagnóstico.

65 El documento WO2007/120240 y J. Anal. Chem. 83 8439-8447 (2011) describen cada uno un enfoque basado en gotículas para caracterizar los ácidos nucleicos que implican pirosecuenciación.

Asimismo, se usan ampliamente sondas biológicas, que típicamente comprenden oligonucleótidos monocatenarios de orden de secuencia conocido de menos de 1000 nucleótidos de longitud, en biología molecular analítica. Dichas sondas funcionan típicamente al unirse a la diana (por ejemplo, una derivada del ADN de un patógeno de origen natural), cuando existe suficiente complementariedad de secuencia entre las bases de nucleótidos de la sonda y la

- 5 diana. Típicamente, los nucleótidos de dichas sondas están marcados con elementos detectables, tales como marcadores radiactivos o fluorescentes, de manera que cuando la sonda se usa para tratar una solución de analito o un sustrato en el que se cree que se ha capturado la diana, la presencia o ausencia de la diana se revela al buscar y detectar la propiedad de detección característica del elemento de detección.
- 10 Una clase de dichas sondas está representada por materiales conocidos en la técnica como "balizas moleculares" como se describe, por ejemplo, en los documentos WO02/06531 o US8211644. Estas sondas están compuestas por oligonucleótidos monocatenarios que, en efecto, se han plegado sobre sí mismos para crear un bucle monocatenario residual que actúa como sensor de la sonda y un tallo corto donde los nucleótidos adyacentes a los dos extremos están unidos entre sí a través del emparejamiento de bases de nucleótidos; creando así una región bicatenaria. Esta
- 15 disposición, que puede compararse con una horquilla en la que el bucle monocatenario se une a las hebras complementarias del mismo extremo de un oligonucleótido bicatenario teórico, está muy tensa. A los extremos libres 3' y 5' del oligonucleótido (ahora adyacentes entre sí y en el extremo remoto del tallo) están unidos respectivamente un fluoróforo y un inactivador. Su proximidad geométrica entre sí garantiza que no se produzca una fluorescencia significativa. Durante el uso, la diana se une al bucle monocatenario causando una tensión adicional, de manera que
- 20 cuando la sonda se calienta, el tallo se despliega, causando el distanciamiento del fluoróforo y el inactivador y permitiendo que el primero tenga fluorescencia.

Ahora se ha desarrollado un nuevo método para determinar la secuencia de bases de nucleótidos en una muestra de polinucleótidos que es diferente de las descritas anteriormente y en la que gotículas individuales que contienen un solo nucleótido, en una corriente derivada de, y cuyo ordenamiento corresponde a, la secuencia del par de bases de nucleótidos de, la muestra se interrogan después de haberse tratado con ciertas sondas biológicas marcadas. Típicamente, el resultado de este tratamiento es generar en cada gotícula uno o más elementos detectables característicos de la base de nucleótidos particular asociada con el nucleótido en la misma. Una característica de este método es el uso de nuevas sondas biológicas en las que los elementos detectables son esencialmente

25 indetectables a menos que se activen específicamente mediante una secuencia de reacciones bioquímicas/enzimáticas que liberan uno o una cascada de los elementos detectables de la sonda en un estado detectable.

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo microfluído para secuenciar un ácido nucleico caracterizado por que comprende:

- una primera zona en la que el analito está contenido y se digiere progresivamente en una corriente de sus nucleótidos individuales constituyentes, en el que la primera zona comprende un medio para digerir progresivamente el analito;
- una ruta microfluída primaria conectada a la primera zona adaptada para permitir el paso de un disolvente portador que contiene una corriente ordenada de microgotas acuosas primarias, al menos algunas de las cuales contienen uno de los nucleótidos individuales;
- una segunda zona dispuesta dentro de la ruta microfluída primaria y que comprende un inyector de microgotas y/o un medio de coalescencia para coalescer secuencialmente microgotas acuosas secundarias de una ruta microfluída secundaria a las microgotas acuosas primarias en la corriente ordenada;
- una zona de almacenamiento conectada a la ruta microfluída primaria aguas abajo de la segunda zona o zonas donde se almacenan las microgotas acuosas primarias;
- una fuente de luz para interrogar a las microgotas en uno o más lugares aguas abajo de la ruta microfluída primaria, y
- un fotodetector para detectar la fluorescencia de las gotículas acuosas primarias en la ubicación o ubicaciones.

Otras características preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones.

- 55 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona, por lo tanto, un método para determinar la secuencia de bases de nucleótidos en un analito polinucleotídico caracterizado por las etapas de:

- a. generar una corriente de gotículas, al menos algunas de las cuales contienen un solo nucleótido y en el que el orden de los nucleótidos individuales en la corriente de gotículas corresponde a la secuencia de nucleótidos en el analito;
- b. introducir en cada gotícula una pluralidad de tipos de sondas biológicas, comprendiendo cada tipo (i) un elemento detectable diferente en un estado no detectable y (ii) que se adapta para capturar un nucleótido único complementario diferente del cual está constituido el analito;
- c. hacer que el único nucleótido contenido en la gotícula se una a su sonda complementaria para crear una sonda usada y
- d. hacer que el elemento detectable se libere de la sonda utilizada en un estado detectable.

En una realización preferida de la divulgación, cada sonda biológica comprende una región nucleotídica monocatenaria cuyos extremos están unidos a dos regiones oligonucleotídicas bicatenarias diferentes en las que al menos una de las regiones oligonucleotídicas comprende elementos detectables que tienen una propiedad de detección característica, y en las que los elementos detectables están dispuestos así en la región oligonucleotídica  
5 cuya propiedad detectable es menos detectable que cuando el mismo número de elementos detectables está unido a un número correspondiente de nucleótidos individuales.

En una realización preferida, los elementos detectables comprenden fluoróforos y la propia sonda es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda en las que los fluoróforos están diseñados para ser detectados. Por lo tanto, aunque un fluoróforo puede exhibir una fluorescencia de fondo general de bajo nivel a través de una gran parte del espectro electromagnético, típicamente habrá una o una pequeña cantidad de longitudes de onda específicas o envolventes de longitud de onda donde la intensidad de la fluorescencia es máxima. Es en uno o más de estos máximos donde se detecta característicamente el fluoróforo en el que esencialmente no debería producirse fluorescencia. En el contexto de la presente divulgación, el término "esencialmente no fluorescente" o redacción equivalente, significa que la intensidad de la fluorescencia del número total de fluoróforos unidos a la sonda en la longitud de onda característica relevante o la envolvente de longitud de onda es inferior al 25 %; preferiblemente inferior al 10 %; más preferiblemente inferior al 1 % y mucho más preferiblemente inferior al 0,1 % de la intensidad de fluorescencia correspondiente de un número equivalente de fluoróforos libres.

En principio, se puede usar cualquier método para asegurar que, en el estado no utilizado de la sonda, los fluoróforos son esencialmente no fluorescentes. Un enfoque es adjuntar adicionalmente los inactivadores cerca de los mismos. Otro se basa en la observación de que, cuando se unen múltiples fluoróforos a la sonda en proximidad cercana unos de otros, tienden a inactivarse entre sí lo suficientemente bien como para que el criterio descrito en el párrafo anterior se pueda lograr sin la necesidad de inactivadores. En este contexto de esta patente, lo que constituye una "proximidad cercana" entre los fluoróforos o entre los fluoróforos y los inactivadores dependerá de los fluoróforos e inactivadores particulares utilizados y posiblemente de las características estructurales de la región o regiones oligonucleotídicas. Por consiguiente, se pretende que este término se interprete con referencia al resultado requerido en lugar de cualquier disposición estructural particular en la sonda. Sin embargo, y con el propósito de proporcionar solo ejemplos, se señala que, cuando los fluoróforos adyacentes o los fluoróforos e inactivadores adyacentes se separan en una distancia correspondiente a la distancia característica de Forster (típicamente menor de 5 nm) se logrará una inactivación suficiente

Preferiblemente, al menos uno de los oligonucleótidos que comprenden la sonda está marcado con hasta 20, preferiblemente hasta 10 y mucho más preferiblemente hasta 5 fluoróforos. Para obtener la máxima ventaja, se prefiere que al menos una de las regiones oligonucleotídicas esté marcada con al menos 2, preferiblemente al menos 3 fluoróforos. Por consiguiente, los intervalos contruidos a partir de cualquier permutación de estos máximos y mínimos se contemplan específicamente en el presente documento. Si se emplean inactivadores, también se prefiere que la sonda esté marcada con hasta 20, preferiblemente hasta 10 y mucho más preferiblemente hasta 5 de la misma. Si bien se prevé que se pueda unir más de un tipo de fluoróforo a la sonda, por ejemplo, para darle una huella característica, se prefiere que todos los fluoróforos unidos a una sonda dada sean del mismo tipo. En una realización, los fluoróforos y los inactivadores se encuentran en diferentes hebras de la región oligonucleotídica o uno frente al otro cuando se crean plegando un precursor oligonucleotídico monocatenario.

Con respecto a los propios fluoróforos, en principio se pueden elegir de cualquiera de los utilizados convencionalmente en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los restos de xanteno, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina B y similares; restos de cumarina (por ejemplo, hidrox-, metilo y aminocumarina) y restos de cianina tales como Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7. Los ejemplos específicos incluyen fluoróforos derivados de los siguientes tintes de uso común: tintes Alexa, tintes de cianina, tintes Atto Tec y tintes de rodamina. Los ejemplos también incluyen: Atto 633 (ATTO- TEC GmbH), Rojo Texas, Atto 740 (ATTO-TEC GmbH), Rosa de Bengala, Alexa Fluor™ 750 C<sub>5</sub>-maleimida (Invitrogen), Alexa Fluor™ 532 C<sub>2</sub>-maleimida (Invitrogen) y C<sub>2</sub>-maleimida Rojo de rodamina y verde de rodamina, así como tintes de fosforamada, tales como Quasar 570. Como alternativa, se puede emplear un punto cuántico o tinte colorante casi infrarrojo tales como los empleados por LI-COR Biosciences. El fluoróforo se une típicamente al oligonucleótido a través de una base de nucleótidos usando métodos químicos conocidos en la técnica.

Los inactivadores adecuados incluyen aquellos que funcionan mediante un mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET). Los ejemplos de inactivadores disponibles comercialmente que se pueden usar en asociación con los fluoróforos mencionados anteriormente incluyen, pero sin limitación, DDQ-1, Dabcilo, Eclipse, Iowa Black FQ y RQ, IR Dye-QC1, BHQ-1, -2 y -3 y QSY- 7 y -21.

La región de nucleótidos monocatenaria comprende un nucleótido que hace que la sonda sea extremadamente selectiva para la detección del nucleótido libre que tiene una base de nucleótidos complementaria. En la práctica, para el ADN esto significa que la región nucleotídica se adaptará para unirse a los nucleótidos cuya base nucleotídica característica se selecciona de guanina, citosina, adenina y timina, o en el caso del ARN de guanina, citosina, adenina y uracilo. Sin embargo, se pueden emplear otros nucleótidos correspondientes a otras bases de nucleótidos (por ejemplo, los constitutivos de otros polinucleótidos sintéticos) si se desea. Cuando se secuencian el

ADN o el ARN, por lo tanto, se utilizará típicamente una mezcla de cuatro sondas diferentes, cada una selectiva para una base de nucleótidos complementaria diferente y empleando cada una un elemento detectable diferente. En una realización preferida, cada sonda tendrá diferentes elementos detectables, por ejemplo, etiquetados con diferentes fluoróforos con fluorescencia en diferentes longitudes de onda características o envolventes de longitud de onda. Por lo tanto, cuando se detecta la fluorescencia característica, el nucleótido se puede identificar de forma única.

Volviendo a la región o regiones oligonucleotídicas bicatenarias, se prefiere que se deriven o puedan derivarse de dos precursores de oligonucleótidos, cada uno preferiblemente en bucle cerrado, o de un precursor oligonucleotídico monocatenario común plegando los dos extremos de este último sobre sí mismos para crear dos regiones oligonucleotídicas de bucle cerrado con un hueco intermedio que constituye la región de nucleótidos monocatenaria. En todos los casos, el efecto es el mismo; adyacente a los extremos de la región nucleotídica monocatenaria estarán los extremos libres 3' y 5' en la otra hebra de la región o regiones oligonucleotídicas bicatenarias a las que se pueden unir los extremos 5' y 3' correspondientes de la diana. Por lo tanto, el uso de la sonda implica así un proceso de unión de la región nucleotídica monocatenaria al único nucleótido de diana al unirse a dichos extremos 3' y 5' para generar una sonda utilizada que es bicatenaria a lo largo de toda su longitud.

Adecuadamente, la región o regiones oligonucleotídicas bicatenarias tienen una longitud de hasta 50 pares de nucleótidos, preferiblemente hasta 45 pares de nucleótidos, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 40 pares de nucleótidos y mucho más preferiblemente en el intervalo de 10 a 30 nucleótidos. Se pueden usar regiones oligonucleotídicas más largas, pero el riesgo potencial de que el acceso a la región nucleotídica por la única diana de nucleótidos se pueda restringir a través del entrelazamiento hace que esta realización sea potencialmente menos atractiva.

Se prefiere que los elementos detectables unidos a los oligonucleótidos se encuentren alejados de la región nucleotídica monocatenaria. Cuando se emplean dos oligonucleótidos discretos, se prefiere que los elementos detectables estén ubicados o agrupados en o hacia uno o ambos de sus extremos que están alejados de la región nucleotídica. Finalmente, se prefiere que al menos uno de los oligonucleótidos comprenda al menos un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción, preferiblemente adyacente a la región donde están localizados o agrupados los elementos detectables. Tal sitio de reconocimiento de enzimas de restricción típicamente comprenderá una secuencia específica de 2 a 8 pares de nucleótidos. En una realización de la divulgación, el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción se crea mediante la unión del nucleótido único a la región de nucleótidos.

Las sondas biológicas utilizadas preferiblemente en el método de la presente divulgación pueden fabricarse en principio mediante cualquiera de las metodologías de ensamblaje de nucleótidos conocidas en la técnica, incluyendo el método de H-fosfonato, la síntesis de fosfodiéster, la síntesis de fosfotriéster y la síntesis del fosfitotriéster. Se prefieren los métodos que emplean componentes básicos fosforamadita nucleotídicos debido a su reactividad. En estos métodos, la síntesis se produce mediante la adición secuencial del fosforamadito nucleotídico elegido a la cadena de nucleótidos en crecimiento en la posición 5' en un proceso cíclico de cuatro etapas que implica el desbloqueo, acoplamiento, protección terminal y oxidación. La naturaleza cíclica de este proceso hace que sea especialmente accesible para la automatización y están disponibles en el mercado máquinas para hacer esto. Cuando se van a introducir activadores y/o fluoróforos, se emplea el fosforamadito nucleotídico marcado adecuadamente en el punto requerido. En una realización más preferida, el método del fosforamadito se usa para hacer un precursor oligonucleotídico monocatenario que se pliega en un ciclo de calentamiento rápido y enfriamiento lento en una sonda que tiene las características deseadas.

En la etapa (a) del método de la presente divulgación, se genera una corriente de gotículas, al menos algunas de las cuales contienen un solo nucleótido. Para fines de secuenciación, es importante que el orden de los nucleótidos individuales en la corriente de gotículas corresponda a la secuencia de nucleótidos en el analito. Adecuadamente, tal corriente de gotículas ordenada se crea introduciendo los nucleótidos individuales estrictamente a su vez en una corriente correspondiente de gotículas vacías. Esto se puede lograr, por ejemplo, pasando una corriente acuosa a través de un régimen donde se liberan nucleótidos individuales del analito y después pasando la corriente a través de un orificio desde el que sale a una corriente de líquido portador inmiscible. Para evitar el riesgo de que una gotícula dada contenga más de un solo nucleótido, se prefiere liberar los nucleótidos individuales en la corriente acuosa a una velocidad tal que cada gotícula llena se separe entre 1 y 20 (preferiblemente 2 y 10) vacías. Posteriormente, se hace que la corriente de gotículas llenas en el vehículo fluya a lo largo de una trayectoria de flujo, adecuadamente una trayectoria de flujo microfluida a una velocidad y de una manera tal que las gotículas se mantengan en un estado discreto y no tengan la oportunidad de coalescer entre sí. En un ejemplo de una realización particularmente adecuada, el vehículo comprende una mezcla de aceite de fluorocarbono (tal como 3M Fluorinert FC40) y un tensioactivo fluorófilo (tal como Sphere Fluidics Picosurf 1), y las gotículas acuosas contienen una mezcla de agua, glicerol, sales iónicas y otros aditivos necesarios para la reacción de la sonda. Preferiblemente, la trayectoria del flujo microfluidado se trata con un recubrimiento o modificación de la superficie que hace que tenga propiedades hidrófobas, evitando así que las microgotas interactúen o se adhieran a ella. Más preferiblemente, esta modificación de la superficie también es oleófila y provoca la formación de una capa de recubrimiento del vehículo en la trayectoria de flujo y el aislamiento adicional de las gotículas acuosas de las paredes del canal. Adecuadamente, las gotículas empleadas tienen un diámetro inferior a 100 micrómetros, preferiblemente inferior a

50 micrómetros (por ejemplo, inferior a 20 micrómetros), más preferiblemente inferior a 10 micrómetros, e incluso más preferiblemente inferior a 5 micrómetros. Mucho más preferiblemente, sus diámetros están en el intervalo de 2 a 20 micrómetros. Típicamente, los nucleótidos individuales son aquellos derivados de un analito polinucleotídico natural, preferiblemente ADN o ARN de origen natural.

5 En la etapa (b) del método, se introducen en cada gotícula una pluralidad de sondas biológicas, preferiblemente una pluralidad de las descritas anteriormente. Preferiblemente, una mezcla de todas las sondas requeridas para detectar todos los analitos de los diversos nucleótidos se introducirá en cada gotícula. Mucho más preferiblemente, estas sondas tendrán cada una múltiples elementos detectables en un estado indetectable unido a las mismas y al menos un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción o el precursor de los mismos. La introducción de la sonda en la gotícula se puede hacer mezclando dos corrientes antes de la generación de gotículas, pero después de la liberación del nucleótido, mediante inyección en las gotículas, o preferiblemente uniendo la corriente de gotículas con una segunda corriente de gotículas (cada gotícula de la cual contiene la mezcla de la sonda) en condiciones en las que las gotículas de las dos corrientes se unen entre sí de manera secuencial para crear una tercera corriente de gotículas más grandes que contienen tanto el nucleótido único como la sonda o las sondas. Al mismo tiempo, se prefiere introducir en cada gotícula una polimerasa y/o una ligasa; aunque estos elementos pueden introducirse por separado si así se desean. Una vez que se ha producido esta introducción, en la etapa (3) se hace que el nucleótido único en la gotícula se una a su sonda complementaria en la mezcla de la sonda a expensas de los demás. En una realización preferida, se hace que esta unión tenga lugar secuencialmente a través del primer uso de la polimerasa para unir el extremo 5' del nucleótido único a un extremo 3' del oligonucleótido y después una ligasa para unir los extremos libres restantes del único nucleótido y el oligonucleótido u otro oligonucleótido juntos. Se puede usar una amplia gama de polimerasas y ligasas, incluidas, pero sin limitación, las derivadas de fuentes bacterianas fácilmente disponibles, tales como el bacteriófago T4, *Escherichia Coli* y *Thermus Aquaticus* (Taq). Preferiblemente, esta etapa se realiza en un medio acuoso en presencia de un exceso de sonda adecuadamente con la relación molar de diana con respecto a la sonda en el intervalo de 1:1 a 1:2000, preferiblemente de 1:1 a 1:200, más preferiblemente de 1:2 a 1:50, siendo de 1:20 a 1:50 el más preferido. Como alternativa, puede emplearse una relación en el intervalo de 1:5 a 1:20.

30 El producto de la etapa (c), es decir, una gotícula que ahora contiene el nucleótido único unido a su sonda complementaria (en lo sucesivo en el presente documento, la sonda usada) y las demás sondas sin reaccionar se trata a continuación en la etapa (d) para que los elementos detectables en la sonda usada se liberen en el medio de gotícula en un estado detectable. Esto permite que se detecten utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, cuando los elementos detectables en la sonda y la sonda utilizada son fluoróforos no fluorescentes, la etapa (d) hace que se liberen de esta última (pero no la primera ni los otros tipos de sonda en la gotícula) en una forma que les permite comenzar a fluorescer completamente. La fluorescencia así generada se puede detectar entonces y medir en cada gotícula utilizando técnicas ópticas o espectroscópicas convencionales para proporcionar un conjunto de datos de salida o una secuencia de datos característica de la secuencia de analito original. Adecuadamente, se hace que la etapa (d) tenga lugar al introducirse en la gotícula, por ejemplo, usando la inyección o preferiblemente una segunda coalescencia del tipo descrito anteriormente, una enzima de restricción (endonucleasa de restricción) y una exonucleasa. En este ejemplo, y cuando los elementos detectables son fluoróforos, la liberación del fluoróforo se produce primero al hacer que la enzima de restricción realice un corte bicatenario en la sonda usada en el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción mencionado anteriormente. Los fragmentos cortos así creados se degradan entonces aún más por la exonucleasa en nucleótidos individuales, algunos de los cuales se marcarán con fluoróforos. Cuando la sonda comprende múltiples fluoróforos inactivados, una realización preferida, esto conduce a una cascada de fluoróforos liberados que, en virtud de que ahora están separados entre sí y/o sus inactivadores asociados, ahora están libres para emitir fluorescencia de la forma normal. Preferiblemente, esta fluorescencia se detecta utilizando un fotodetector o un dispositivo equivalente sintonizado con la longitud de onda de fluorescencia característica o la envolvente de longitud de onda del fluoróforo. En un ejemplo de una realización, el fotodetector comprende una cámara sCMOS de alta sensibilidad (Zyla 10-tap sCMOS, Andor Technology) en la cual se forma una imagen de las gotículas utilizando una combinación de una lente objetivo (UPLSAPO 60xW, Olympus) y una lente de tubo acromático estándar. La excitación de la emisión de fluorescencia en esta realización utiliza un conjunto de láseres que se introducen en la trayectoria óptica a través de un espejo dicróico. Un aparato de escaneo externo desvía los rayos láser a través de las gotículas. La emisión de fluorescencia resultante de este proceso hace que el fotodetector genere una señal eléctrica que se puede procesar y analizar de la manera normal. Como se menciona anteriormente, se prefiere detectar los elementos detectables por medios ópticos o espectroscópicos.

60 Típicamente, la etapa (d) también se realiza en un medio acuoso y con un exceso de enzimas. Con el fin de evitar la degradación de la sonda biológica no utilizada, se prefiere que el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción sea el formado añadiendo el nucleótido único a la región nucleotídica monocatenaria o, como alternativa, que la enzima de restricción se elija para que no reaccione con oligonucleótidos bicatenarios que contienen mellas en los mismos. Por lo tanto, la enzima de restricción se elegirá teniendo en cuenta las características del sitio de la enzima de restricción y, en particular, será una que muestre una alta fidelidad para el sitio si las sondas van a funcionar de manera óptima. Las exonucleasas adecuadas incluyen Dnasa I (exenta de RNasa), Exonucleasa I o III (por ejemplo, *E. coli*), Exonucleasa T, Exonucleasa V (RecBCD), Exonucleasa Lambda, Nucleasa Microcócica, Nucleasa de judía mungo, Nucleasa BAL-31, RecJ<sub>r</sub>, Exonucleasa T5 y Exonucleasa T7.

Típicamente, el caudal de gotículas a través del dispositivo está en el intervalo de 50 a 3000 gotículas por segundo, preferiblemente de 100 a 2000.

5 En un ejemplo de una realización adecuada, se usa una corriente acuosa cofluida que contiene dos conjuntos de reactivos para generar las gotículas. Al combinar dos corrientes cerca del sitio de generación de gotículas, los componentes de la mezcla de reacción se pueden mantener separados durante el mayor tiempo posible.

El método de secuenciación de gotículas de la presente divulgación se ilustra ahora con referencia al siguiente dispositivo en el que:

10 La Figura 1 ilustra esquemáticamente una unidad de microfluído en la que las gotículas, cada una de las cuales contiene un solo nucleótido, se hacen reaccionar con las sondas biológicas como se describe anteriormente.

A través de un tubo microfluído de diez micrómetros de diámetro fluye una corriente acuosa 1 que contiene nucleótidos individuales obtenidos de un analito polinucleotídico de base de 100 nucleótidos derivado de ADN humano y polimerasa del fragmento de Klenow. El orden de los nucleótidos en el flujo de gotículas corresponde a la secuencia del analito. La corriente de nucleótidos individuales se puede generar por degradación de una sola hebra del analito que se encuentra en la superficie interna del tubo. 1 emerge de una cabeza de gotícula 2 en una primera cámara 3 donde se pone en contacto con una o más corrientes de aceite de silicona ligero 4. Las velocidades de estas corrientes se eligen para evitar la mezcla turbulenta y para crear gotículas esféricas sustancialmente acuosas 5 suspendidas en el aceite, teniendo cada una un diámetro de aproximadamente ocho micrómetros. Después, se lleva una corriente de 5 a lo largo de un segundo tubo microfluído del mismo diámetro a una velocidad de 1000 gotículas por segundo a una segunda cámara 6 en la que se alimenta una segunda corriente de gotículas esféricas 7 de cinco micrómetros usando una segunda cabeza de gotícula 8. Se hace que las gotículas 5 y 7 se unan en coalescencia de manera secuencial para formar gotículas acuosas agrandadas de aproximadamente 9 de aproximadamente nueve micrómetros de diámetro. Cada uno de 7 contiene la mezcla de la sonda descrita a continuación, la ADN ligasa de E. coli y cuatro enzimas de restricción, cada una adecuada para cortar de forma única un tipo de sonda usado diferente en un sitio de reconocimiento único creado por la unión del nucleótido individual relevante. En este ejemplo, el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción tiene una longitud de cuatro nucleótidos. La relación molar del nucleótido individual a cada sonda en cada uno de 9 es 1:20.

30 A continuación, una corriente de 9 se transporta a la misma velocidad a través de un tubo microfluído a una tercera cámara 10, donde se pone en contacto con una tercera corriente de gotículas esféricas 11 de cinco micrómetros también alimentadas a la misma a través de la cabeza de gotícula 12. El tiempo necesario para cada uno de 9 para moverse entre las cámaras es de 30 minutos.

35 Se hace que 9 y 11 se unan en coalescencia en 10 para producir gotículas 13 (aproximadamente diez micrómetros de diámetro). Cada uno de 11 contiene exonucleasa Lambda en cantidad catalítica. Una corriente de gotículas 13 se transporta entonces hacia la entrada del sistema de detección. Durante este tiempo y dentro del cartucho, la exonucleasa degrada entonces el fragmento de oligonucleótido recortado generado por la enzima de restricción en el proceso de liberación de una cascada de nucleótidos individuales con fluoróforos ahora no inactivados unidos al mismo. El contenido de las gotículas se tampona a un pH en el intervalo de 7,9 a 8 en todo momento.

45 El sistema de detección (no mostrado) comprende típicamente un cartucho que consiste en un canal o depósito en el que cada una de las gotículas en 13 se almacena en condiciones que aseguran su integridad. Dicho cartucho está dotado de al menos una cara hecha de plástico transparente o material similar que permite que cada gotícula almacenada sea interrogada con luz incidente de un microscopio/láser/fotodetector. Esto, a su vez, hace que los fluoróforos liberados en cada gotícula tengan una fluorescencia de una manera característica del nucleótido individual que contenían originalmente (o nada en absoluto si la gotícula estaba originalmente vacía). Por lo tanto, a medida que las gotículas se interrogan a su vez, la secuencia de bases de nucleótidos en el polinucleótido original se puede leer. Durante el uso, el cartucho se llena, se sella y, una vez que la exonucleasa ha terminado de liberar los fluoróforos (típicamente en 1 a 2 horas), se interroga. Si se desea, el líquido portador de gotículas puede ser o puede contener un monómero orgánico o inorgánico (por ejemplo, un epóxido) cuya polimerización puede iniciarse mediante luz ultravioleta para crear una matriz clara y sólida para las gotícula que permite que los cartuchos se almacenen fácilmente de forma indefinida si es así necesario.

55 Lo siguiente ilustra cómo se puede preparar una mezcla de sonda adecuada para su uso en el dispositivo descrito anteriormente.

60 Un precursor de oligonucleótido monocatenario de 103 nucleótidos (por ejemplo, ATDBio) que tiene la secuencia de bases de nucleótidos:

(5')GGCACGATGGXXAXXGCCCGCACTTCAGCGGGCAAYAACCATCGTGCCTGCAGGCTCGACCTTTATTTCG  
CGGCACTTCAGCCGCGAATAAAGGTGCAGCCTGC(3')

65 en la que X son bases T marcadas con Quasar 570 (fluoróforo) y en la que Y son bases T marcadas con bloqueador BHQ-2, se pliega sobre la base del nucleótido 49<sup>a</sup> calentando una solución acuosa de esto a 95 °C y después se

enfria lentamente a la temperatura ambiente a una velocidad de 10 minutos por °C. Al final de este tiempo, se forma una sonda de bucle cerrado de acuerdo con la presente divulgación en la que la base del nucleótido 49ª (aquí T) comprende la región de nucleótidos monocatenaria y dos oligonucleótidos bicatenarios, respectivamente, de 24 y 27 pares de bases de nucleótidos de largo, flanqueándola.

5 A continuación, A continuación, se preparan otras tres sondas adecuadas para capturar las otras tres bases de nucleótidos partiendo de tres oligonucleótidos de base de 103 nucleótidos similares en los que la base 49ª anterior es A, G o C, según sea el caso. En estos casos, las bases X comprenden bases T marcadas respectivamente con: Fluoresceína (517 nm), Rojo Texas (612 nm) y cianina-5 (667 nm). Después, se prepara una mezcla de sondas  
10 mezclando las cuatro sondas en cantidades equimolares.

LISTA DE SECUENCIAS

- 15 <110> Base4 Innovation Limited
- <120> Método de secuenciación
- <130> P56203EP1
- 20 <140> PCT/GB2013/052595
- <141> 04-10-2013
- <150> GB1217772.1
- 25 <151> 04-10-2012
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 103
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Sonda biológica
- <220>
- 40 <221> modified\_base
- <222> (11)..(12)
- <223> Las bases se etiquetan con Quasar 570 (fluoróforo)
- <220>
- 45 <221> modified\_base
- <222> (14)..(15)
- <223> Las bases se etiquetan con Quasar 570 (fluoróforo)
- <220>
- 50 <221> modified\_base
- <222> (36)..(36)
- <223> La base se etiqueta con el inactivador BHQ-2
- <400> 1
  
- 60
- 103
- 55
- <210> 2
- <211> 103
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 733 934 T3

<223> Sonda biológica  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 5 <222> (11)..(12)  
 <223> Las bases se etiquetan con fluoresceína (517 nm)  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 10 <222> (14)..(15)  
 <223> Las bases se etiquetan con fluoresceína (517 nm)  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 15 <222> (36)..(36)  
 <223> La base se etiqueta con el inactivador BHQ-2  
 <400> 2  
  
**ggcacgatgg ttattgcccg cacttcagcg ggcaataacc atcgtgccag caggctcgac 60**  
 20 **ctttattcgc ggcacttcag ccgcaataa aggtcgagcc tgc 103**  
 <210> 3  
 <211> 103  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sonda biológica  
 30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> Las bases se etiquetan con Rojo Texas (612 nm)  
 35 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (14)..(15)  
 <223> Las bases se etiquetan con Rojo Texas (612 nm)  
 40 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (36)..(36)  
 <223> La base se etiqueta con el inactivador BHQ-2  
 45 <400> 3  
  
**ggcacgatgg ttattgcccg cacttcagcg ggcaataacc atcgtgccgg caggctcgac 60**  
**ctttattcgc ggcacttcag ccgcaataa aggtcgagcc tgc 103**  
 <210> 4  
 <211> 103  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Sonda biológica  
 55 <220>  
 <221> modified\_base

# ES 2 733 934 T3

<222> (11)..(12)

<223> Las bases se etiquetan con cianina-5 (667 nm)

<220>

5 <221> modified\_base

<222> (14)..(15)

<223> Las bases se etiquetan con cianina-5 (667 nm)

<220>

10 <221> modified\_base

<222> (36)..(36)

<223> La base se etiqueta con el inactivador BHQ-2

<400> 4

15

ggcacgatgg ttattgcccg cacttcagcg ggcaataacc atcgtgcccg caggctcgac 60

ctttattcgc ggcacttcag ccgcgaataa aggtcgagcc tgc 103

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluido para secuenciar un ácido nucleico caracterizado por que comprende:
- 5       • una primera zona en la que el analito está contenido y se digiere progresivamente en una corriente de sus nucleótidos individuales constituyentes, en el que la primera zona comprende un medio para digerir progresivamente el analito;
- 10       • una ruta microfluida primaria conectada a la primera zona adaptada para permitir el paso de un disolvente portador que contiene una corriente ordenada de microgotas acuosas primarias, al menos algunas de las cuales contienen uno de los nucleótidos individuales;
- 15       • una segunda zona dispuesta dentro de la ruta microfluida primaria y que comprende un inyector de microgotas y un medio de coalescencia para coalescer secuencialmente microgotas acuosas secundarias de una ruta microfluida secundaria a las microgotas acuosas primarias en la corriente ordenada para formar gotículas secundarias;
- 20       • una tercera zona dispuesta dentro de la ruta microfluida primaria y que comprende un inyector de microgotas y medios de coalescencia para coalescer secuencialmente microgotas acuosas terciarias de una ruta microfluida terciaria para coalescer con las gotículas acuosas secundarias en la corriente ordenada para formar gotículas terciarias;
- un cartucho conectado a la ruta microfluida primaria en la que se almacenan las microgotas terciarias acuosas;
- una fuente de luz para interrogar a las microgotas aguas abajo de la ruta microfluida primaria y
- un fotodetector para la detección de fluorescencia.
2. Un dispositivo microfluido según la reivindicación 1, caracterizado por que el cartucho consiste en un canal o depósito.
- 25       3. Un dispositivo microfluido según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que al menos una cara del cartucho es transparente.
- 30       4. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la primera zona incluye un medio para localizar el analito en una superficie interna.
- 35       5. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la ruta microfluida primaria está adaptada para permitir el paso de microgotas acuosas primarias de menos de 50 micrómetros de diámetro.
- 40       6. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la segunda zona incluye dos cámaras de coalescencia de microgotas secundarias dispuestas en serie y conectadas a rutas microfluidas secundarias.
- 45       7. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la superficie interna de la ruta microfluida primaria incluye un recubrimiento hidrófobo o una modificación de la superficie hidrófoba.
8. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que incluye además un escáner externo para desviar la fuente de luz a través de las microgotas acuosas primarias.
9. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la fuente de luz es un láser.
- 50       10. Un dispositivo microfluido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el fotodetector es una cámara sCMOS y las microgotas se interrogan utilizando una fuente de luz que comprende una pluralidad de láseres y un espejo dicróico.
- 55       11. Un dispositivo de microgotas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además un controlador para controlar la velocidad del flujo de microgotas acuosas primarias a lo largo de la ruta microfluida primaria en el intervalo de 50 a 3000 microgotas por segundo.

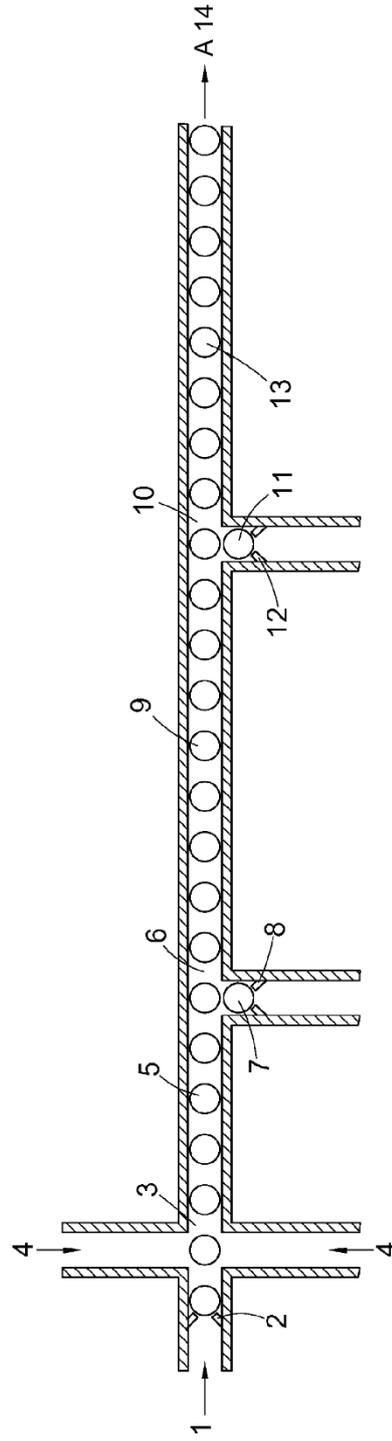


FIG. 1