

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 635**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6869** (2008.01)

**C12Q 1/686** (2008.01)

**C12Q 1/6851** (2008.01)

**G01N 35/00** (2006.01)

**C40B 60/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2016 PCT/EP2016/067148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17013102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2016 E 16742239 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021 EP 3325697**

54 Título: **Secuenciación optimizada de muestras clínicas**

30 Prioridad:

**23.07.2015 EP 15178159**

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

**17.03.2022**

73 Titular/es:

**BIOCARTIS NV (100.0%)  
Generaal De Wittelaan 11 B3  
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**VERGAUWE, NICOLAS y  
MEERSSEMAN, GEERT**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 900 635 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

Secuenciación optimizada de muestras clínicas

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere generalmente a sistemas automatizados capaces de realizar de forma concomitante análisis de PCR cuantitativa (qPCR) de ácidos nucleicos presentes en una muestra biológica, junto con la preparación de una biblioteca de ácidos nucleicos lista para secuenciar a partir de dicha muestra, ya sea de forma simultánea o secuencial. En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a métodos automatizados para realizar una qPCR en un ácido nucleico presente en una muestra biológica junto con la preparación simultánea o secuencial de una biblioteca de ácidos nucleicos lista para secuenciar a partir de dicha muestra.

## 15 Antecedentes de la invención

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real, es una herramienta poderosa y muy versátil para el análisis de ácidos nucleicos diana. Como muchas otras técnicas basadas en PCR, la qPCR usa cebadores específicos diana para la amplificación y/o detección de un ácido nucleico de elección. Actualmente, la qPCR es reconocida como una técnica estándar dorada para el diagnóstico y se utiliza ampliamente en laboratorios y clínicas de todo el mundo.

Entre otros campos y aplicaciones, la qPCR se emplea ampliamente en oncología clínica para discriminar entre ácidos nucleicos de tipo silvestre y mutantes tanto para fines de diagnóstico como para identificar alelos procesables adecuados para terapias dirigidas. La técnica es rápida, robusta y funciona muy bien en la mayoría de los cánceres que se sabe que son probablemente impulsados por un número limitado de mutaciones bien definidas; por ejemplo, melanoma en el que BRAF y NRAS mutados son los sospechosos habituales. Sin embargo, en los casos en que falla la detección de la mutación esperada más probable o un conjunto de mutaciones, se puede enfrentar una situación en la que se tendría que analizar una gran cantidad de genes (cada uno con un conjunto diferente de cebadores y/o sondas específicos) antes de que se identifique al menos una diana potencialmente procesable.

En tales casos, puede resultar necesario realizar un seguimiento diagnóstico de una muestra de cáncer determinada con una técnica que proporcione una cobertura génica más amplia e independiente de la secuencia. Por ejemplo, el documento WO12024658 divulga un secuenciador modular automatizado basado en perlas de "muestra a secuencia integrado" que puede comprender un módulo de procesamiento de muestras, un módulo de construcción de bibliotecas, un módulo de normalización y un módulo de secuenciación, por lo que el primer módulo de procesamiento de muestras puede comprender un cartucho de microfluidos. Además, el solicitante ya presentó una plataforma basada en cartuchos que utiliza una secuenciación Sanger o Pyro, aunque sin la preparación de una biblioteca (Schiefer et al., 2014). Por tanto, un enfoque particularmente adecuado para un propósito implica la secuenciación de alto rendimiento, también conocida como secuenciación de segunda generación o secuenciación de próxima generación (NGS), que contrasta con la secuenciación clásica basada en la estrategia de Sanger mucho más lenta. A pesar de los costes cada vez menores de los análisis de NGS (precio récord bajo de \$1000 por genoma alcanzado en 2014), la técnica sigue siendo relativamente costosa. Además, se considera en gran medida laborioso debido a las múltiples etapas preparatorias, como la verificación de la cantidad y la calidad del ácido nucleico, seguida de la generación de una biblioteca de ácidos nucleicos lista para la secuenciación. Sin embargo, lo más importante es que la NGS produce grandes cantidades de datos por procedimiento, lo que plantea desafíos computacionales adicionales para analizarlos y requiere personal altamente calificado para la interpretación de datos. Por lo tanto, siempre que sea posible, la qPCR mucho más económica y rápida es el método de diagnóstico preferido; no obstante, NGS sigue siendo una opción de seguimiento válida y, a menudo, valiosa, si no necesaria.

Como se mencionó anteriormente, una consideración clave para un análisis de NGS exitoso es si el ácido nucleico proporcionado en una muestra está presente en una cantidad suficiente y si tiene una calidad suficiente para generar una biblioteca satisfactoria para la secuenciación. Los métodos de verificación de ácido nucleico convencionales usados para este propósito implican enfoques estándar tales como medición de absorbancia (densidad óptica), electroforesis en gel de agarosa o fluorimetría, por ejemplo, utilizando tintes fluorescentes de unión a ADN. Más recientemente, con el fin de ahorrar tanto como sea posible de la muestra de ácido nucleico destinada a NGS, solo una parte de ella se somete a una PCR, cuyo producto se utiliza luego para realizar las evaluaciones de cantidad y calidad necesarias. Los productos de PCR comúnmente utilizados para este propósito se generan, por ejemplo, utilizando elementos nucleares intercalados cortos (SINE), como las repeticiones de Alu, o elementos nucleares intercalados largos (LINE) (véase, Buehler et al. 2010).

Debe observarse que las etapas preparatorias enumeradas anteriormente existen como ensayos independientes que se realizan solo después de que se haya tomado la decisión de proceder al análisis de NGS. No es una práctica común preparar una biblioteca de secuenciación de forma profiláctica para asegurar los ácidos nucleicos obtenidos de una muestra clínica en caso de que se requiera un seguimiento de la NGS en el futuro. Esto se debe principalmente a que las etapas de control de calidad y preparación de la biblioteca requieren tiempo adicional del personal capacitado, lo que aumenta el coste general de todo el proceso de manipulación de muestras. De hecho, en cuanto al coste de los

reactivos, estas etapas probablemente sean la parte más económica de todo el flujo de trabajo de NGS.

5 Generando automáticamente una biblioteca lista para secuenciación ya sea en la etapa del cribado de qPCR estándar inicial de muestras clínicas, no solo se ahorraría tiempo y recursos humanos capacitados, sino que también se garantizaría una mejor gestión de muestras clínicas valiosas y limitadas en cantidad. Una ventaja adicional de tal solución sería la capacidad de generar o usar inmediatamente la información de la reacción qPCR monitoreada en tiempo real como una indicación de la cantidad y calidad del ácido nucleico y, por lo tanto, su idoneidad para la generación de bibliotecas de NGS. La siguiente ventaja sería la capacidad de comparar directamente los resultados de qPCR y los resultados obtenidos posteriormente de un análisis de NGS de la biblioteca generada concomitantemente con y en la misma máquina que dicha qPCR, ya sea al mismo tiempo (es decir, simultáneamente) o poco tiempo después (es decir, secuencialmente) y, lo que es más importante, usando el mismo grupo de ácido nucleico procesado de manera idéntica. Además, al eliminar así la separación temporal habitual entre un análisis de qPCR y la estabilización de los ácidos nucleicos libres en forma de biblioteca, se podrían minimizar aún más las posibles dicotomías analíticas entre los resultados de qPCR y NGS, derivadas de períodos prolongados de almacenamiento de muestras biológicas o ácidos nucleicos libres aislados de los mismos, que pueden provocar su degradación al menos parcial.

20 La presente invención aborda las ventajas anteriores proporcionando sistemas y métodos automatizados para realizar un análisis de qPCR altamente sensible combinado con la preparación de una biblioteca de NGS a partir de la misma muestra biológica. Al hacerlo, la presente invención no solo permite la verificación de la calidad de la muestra junto con la preparación de una biblioteca de NGS, sino que además proporciona medios para el descubrimiento inmediato en profundidad de mutaciones impulsoras antes de la comprensión más amplia proporcionada por NGS de las alteraciones genómicas presentes en una muestra determinada. Esta y otras ventajas de la presente invención se presentan a continuación.

25 Sumario de la invención

30 La presente divulgación se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. En particular, la presente divulgación se refiere a un sistema automatizado para el análisis de PCR cuantitativa (qPCR) de un ácido nucleico presente en una fuente de ácido nucleico, tal como una muestra biológica, recibida en dicho sistema y para la preparación concomitante de una biblioteca de secuenciación de ácidos nucleicos a partir de dicha fuente de ácido nucleico, comprendiendo el sistema:

- un medio para realizar PCR cuantitativa (qPCR) que comprende un compartimento de termociclado que comprende los reactivos necesarios para realizar una qPCR, también denominado "compartimento de termociclado de qPCR";

35 dicho sistema se caracteriza porque

- comprende además un medio para preparar una biblioteca de ácido nucleico que comprende un compartimento de la biblioteca separado del compartimento de termociclado de qPCR, comprendiendo dicho compartimento de la biblioteca los reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácido nucleico que incluye secuencias adaptadoras específicas de NGS.

40 Preferiblemente, el sistema automatizado de la presente divulgación es un sistema para microfluidos basado en un cartucho. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un cartucho extraíble para el sistema automatizado de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho cartucho:

- al menos un compartimento de termociclado de qPCR que comprende los reactivos necesarios para realizar una qPCR; y

45 - al menos un compartimento de la biblioteca separado del compartimento de termociclado de qPCR, comprendiendo dicho compartimento de la biblioteca los reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácido nucleico que incluye secuencias adaptadoras específicas de NGS.

En realizaciones preferidas, el cartucho de la invención incorpora además preferiblemente medios para recibir una muestra biológica y medios para liberar ácido nucleico de la muestra biológica.

50 Finalmente, la divulgación también proporciona un método para realizar qPCR con una preparación concomitante de una biblioteca de ácidos nucleicos en el sistema automatizado de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

55 a) recibir una fuente de ácido nucleico en el sistema automatizado, comprendiendo dicha fuente de ácido nucleico ácido nucleico;

b) opcionalmente, liberar en dicho sistema automatizado el ácido nucleico de al menos una parte de dicha fuente recibida de ácido nucleico;

60 c) realizar una qPCR sobre el ácido nucleico proporcionado o liberado de la fuente de ácido nucleico, comprendiendo

la qPCR termociclar dicho ácido nucleico en el compartimento de termociclado de qPCR comprendido en dicho sistema;

- d) preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el compartimento de la biblioteca comprendido en dicho sistema; en el que las etapas c) y d) se realizan en dicho sistema automatizado de forma secuencial o simultánea.

5

#### Definiciones

El término "PCR cuantitativa" o simplemente "qPCR" se refiere en el presente documento a la definición de una técnica de laboratorio basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se utiliza para amplificar y detectar o cuantificar simultáneamente una molécula de ADN diana. A diferencia de la PCR estándar en la que el producto de la reacción se detecta al final, es decir, una vez finalizado el termociclado, la característica clave de la qPCR es que el producto de ADN se detecta durante el termociclado a medida que la reacción progresa en "tiempo real"; de ahí el nombre alternativo de la qPCR como "PCR en tiempo real". Actualmente existen muchos tipos diferentes de qPCR. Por ejemplo, cuando se comienza con una etapa de transcripción inversa (RT), la qPCR se puede usar para cuantificar el número de ARN mensajeros y luego se denomina qPCR de transcriptasa inversa o RT-qPCR. Como se usa en este documento, los términos "PCR cuantitativa" o simplemente "qPCR" se emplearán con preferencia sobre el término "PCR en tiempo real" o "RT-PCR" para evitar confusiones con la PCR de transcripción inversa, también abreviada frecuentemente como RT-PCR. La mayoría de las qPCR utilizan uno de los dos métodos más comunes para detectar la amplificación del producto en tiempo real: (a) intercalación de tintes fluorescentes no específicos con cualquier ADN de doble cadena, o (2) sondas de ADN específicas de secuencia que consisten en oligonucleótidos que están marcados con un indicador fluorescente que permite la detección solo después de la hibridación de la sonda con su secuencia diana complementaria. Las señales fluorescentes generadas durante el termociclado son detectadas por un sistema de detección óptica apropiado y rastreadas desde el momento en que pasan el umbral de fondo hasta que la reacción alcanza la meseta. El número de copias de las secuencias diana se puede estimar utilizando una estrategia de cuantificación relativa o absoluta, normalmente analizando la forma de la curva de amplificación obtenida (estrategia de curva estándar) o determinando cuándo la señal supera algún valor umbral (a menudo llamado valor Ct, pero algunas veces también el valor Cp o el valor Cq). En la cuantificación relativa, los niveles de ácido nucleico diana estimados en una muestra dada usando el análisis de curva estándar o Ct se expresan en relación con los valores obtenidos para la misma diana en otra muestra de referencia, por ejemplo, una muestra de control sin tratar. Por el contrario, en la cuantificación absoluta, la señal de qPCR está relacionada con el número de copias de entrada utilizando una curva estándar o también se puede calcular de acuerdo con un método de PCR digital más reciente. Por el momento, la primera estrategia es aún más prevalente y basa la estimación de la cantidad de ADN diana en la comparación de los valores obtenidos con una curva estándar previamente elaborada. Estas y otras estrategias de cuantificación de qPCR son ampliamente conocidas en la técnica y su cálculo puede diferir en mayor o menor tamaño dependiendo de una aplicación dada y un sistema de qPCR.

Como se usa en el presente documento, el término "medios para realizar una PCR cuantitativa" debe entenderse como la disposición mínima necesaria de reactivos y elementos para realizar una qPCR. Por lo general, incluirán cualquier reactivo que permita un termociclado de PCR detectable en tiempo real de una plantilla de ácido nucleico recibida de una fuente de ácido nucleico. Dichos reactivos incluyen, pero dependiendo del tipo de qPCR no se limitan a una polimerasa de grado PCR, al menos un conjunto de cebadores, un tinte detectable o una sonda, dNTP, tampón de PCR, etc. Además, los "medios para realizar PCR cuantitativa" generalmente también incluirán cualquier estándar conocido en la técnica de ensamblaje mínimo de piezas, que generalmente incluye pero no se limita a lo siguiente: (1) un compartimento adecuado (también denominado "un compartimento de termociclado de qPCR") en el que puede tener lugar el termociclado detectable en tiempo real. Dichos compartimentos pueden, por ejemplo, estar formados por una cámara adecuada para amplificar ácidos nucleicos, es decir, hecha de material apropiado y que proporcione suficiente regulación de la temperatura interna, y que también comprenda al menos una pared que permita la detección en tiempo real de las señales generadas durante dicha amplificación, por ejemplo, una pared transparente a la luz. Además, (2) medios para variar la temperatura en esta cámara u otro compartimento, como se conoce ampliamente en varias máquinas de termociclado existentes. Luego, (3) medios para detectar las señales generadas durante el termociclado de qPCR, tal como un detector óptico acoplado a un ordenador, etc. En resumen, dicho ensamblaje mínimo incluirá normalmente cualquier sistema o sistemas conocidos en la técnica capaces de iniciar y mantener la reacción de termociclado en el compartimento de termociclado de qPCR, ajustando y regulando la temperatura para asegurar condiciones de termociclado estables en el mismo, etc.; además, también incluirá cualquier dispositivo o dispositivos de detección apropiados, medios para el procesamiento de datos (por ejemplo, un ordenador conectado alternativamente a una base de datos) y sistemas de salida que permitan leer y controlar el termociclado de la reacción qPCR en tiempo real (usualmente una pantalla de ordenador que muestra el progreso de la reacción en una interfaz gráfica de usuario apropiada); así como cualquier paquete de software adecuado para operar la maquinaria y/o visualizar y posiblemente también ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos.

Además, como se usa en el presente documento, el término "biblioteca de secuenciación" o "biblioteca de secuenciación de ácidos nucleicos" se refiere a un conjunto de polinucleótidos, la mayoría de las veces de tipo ADN, que están listos para el análisis de secuencia, en particular usando cualquiera de las estrategias de secuenciación de próxima generación (NGS) conocidas actualmente. De acuerdo con esto, en una realización actualmente preferida de la invención, una biblioteca de secuenciación está compuesta por una pluralidad de moléculas de ADN amplificadas

65

por PCR, más preferiblemente fusionadas con moléculas adaptadoras (o secuencias adaptadoras) compatibles con una estrategia de NGS dada de elección. Se puede encontrar una descripción completa de los tipos de bibliotecas de secuenciación y las formas de prepararlos en una revisión de van Dijk et al., Exp Cell Res. 2014.

5 De manera similar, como se usa en este documento, el término "medios para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos" debe entenderse como elementos mínimos necesarios para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos adecuada para NGS, que incluye al menos un compartimento donde se recibe un ácido nucleico de una fuente de ácido nucleico puede someterse a la preparación de una biblioteca de ácidos nucleicos; los reactivos mínimos necesarios para la preparación de la biblioteca, como la enzima apropiada o una mezcla de enzimas, secuencias adaptadoras específicas de la estrategia de NGS o adaptadores, tampón, etc.); y también un estándar conocido en la técnica de la maquinaria y el software adecuados para por ejemplo, iniciar y/o dirigir el procedimiento de preparación de la biblioteca. Como se usa en este documento, el término "reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos" debe entenderse como cualquier mezcla de reactivos conocidos en la técnica que sean suficientes para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos que pueda usarse para la NGS. Preferiblemente, "reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos" puede interpretarse como cualquier mezcla de reactivos conocidos en la técnica que sean suficientes para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos que pueda usarse directamente para NGS, es decir, que comprenda secuencias adaptadoras específicas de NGS que sean compatible con una determinada estrategia de NGS de elección. Dichos reactivos pueden comprender secuencias de cebadores en las que las secuencias adaptadoras específicas de NGS están incluidas en las secuencias de cebadores y la mezcla de reactivos comprende enzimas, sustratos y condiciones de tamponamiento que permiten realizar una biblioteca de PCR con dichos cebadores. Alternativamente, tales secuencias adaptadoras específicas de NGS pueden ser adecuadas para la ligación y pueden proporcionarse en una mezcla de reactivos que también comprenda enzima ligasa.

25 Además, el término "medios para liberar o purificar ácido nucleico de la muestra biológica" debe entenderse como cualquier pluralidad de reactivos químicos y/o elementos físicos conocidos en la técnica que se sabe que se usan para liberar ácidos nucleicos de células u otras estructuras en una muestra biológica y, en caso de purificación, separar suficientemente dichos ácidos nucleicos de los restos de muestra no deseados en una forma aceptablemente pura (en la que el término "aceptablemente" depende del propósito adicional de dichos ácidos nucleicos purificados), generalmente en una solución acuosa. Los reactivos químicos adecuados para tal fin incluyen, por ejemplo, cualquier detergente y/o tampón conocido en la técnica que comprenda detergentes, agentes caotrópicos, inhibidores de nucleasas, etc. que se utilicen en la disgregación y/o licuefacción de tejidos o células, liberando así los ácidos nucleicos contenidos en ellos en una solución. De manera similar, los elementos físicos conocidos en la técnica que se usan en varios métodos de procesamiento de muestras con el propósito de liberar/purificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, soportes sólidos de sílice tales como resinas en columnas de centrifugación, membranas de sílice, perlas, etc.; otros disruptores mecánicos o máquinas que generan energía disruptiva tales como sonicadores, etc.

Entonces, el término "ácido nucleico" y su "polinucleótido" equivalente, como se usa en este documento, se refieren a un polímero de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que comprende enlaces fosfodiéster entre subunidades de nucleótidos. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN, por ejemplo, incluyendo ADN genómico, mitocondrial o ADNme, ADNc, ARNm, ARNr, ARNt, ARNnh, microARN, ARNncl y varias versiones modificadas de los mismos. Los ácidos nucleicos se pueden obtener más comúnmente de fuentes naturales tales como muestras biológicas obtenidas de diferentes tipos de organismos. Por otro lado, los ácidos nucleicos también se pueden sintetizar, recombinar o producir de otro modo en cualquiera de los métodos conocidos ideados por humanos (por ejemplo, método de amplificación de ácidos nucleicos como PCR).

Como se usa en este documento, el término "fuente de un ácido nucleico" debe entenderse como cualquier sustancia, ya sea líquida o sólida, que comprende o se espera que comprenda un ácido nucleico. Una fuente de ácido nucleico puede, por ejemplo, ser una solución creada artificialmente que comprende un ácido nucleico sintético o recombinante tal como, entre muchas otras, una solución que contiene un producto de ligación, un marcador de electroforesis (llamado "escalera"), una existencia de cebadores, etc. Sin embargo, lo más común es que una fuente de ácido nucleico sea una muestra biológica obtenida de un organismo o de células formadoras o derivadas del mismo, preferiblemente una muestra clínica obtenida de un paciente.

55 Como se usa en este documento, el término "muestra biológica" o simplemente "muestra" pretende incluir una variedad de muestras biológicas que contienen ácido nucleico y/o material celular, por ejemplo, incluidos: cultivos de células tales como células de mamíferos, pero también de microorganismos eucariotas, fluidos corporales, precipitados de fluidos corporales, muestras de lavado, aspirados con aguja fina, muestras de biopsias, muestras de tejido, células cancerosas, otros tipos de células obtenidas de un paciente, células de un tejido o células cultivadas *in vitro* de un individuo que está siendo analizado y/o tratado para detectar una enfermedad o infección, o muestras forenses. Ejemplos no limitativos de muestras de fluidos corporales incluyen sangre completa, médula ósea, líquido cefalorraquídeo (CSF), líquido peritoneal, líquido pleural, líquido linfático, suero, plasma, orina, líquido lechoso formado por gotitas de grasa y linfa, heces, eyaculación, esputo, aspirado del pezón, saliva, muestra de hisopos, líquido de lavado o lavatorio y/o muestras obtenidas con cepillo.

Una vez que se proporciona una muestra biológica a los sistemas o durante la realización de los métodos de la

invención, normalmente se pondrá en contacto con una composición para proporcionar un lisado en el que se libera ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, "poner en contacto" significa reunir, exponer, incubar o mezclar la muestra y la composición. "Liberar" se refiere a liberar, obtener y/o invertir el entrecruzamiento. Para liberar ácido nucleico de una muestra, la composición puede requerir actividad proteasa y tamponamiento del pH. La liberación puede requerir de la composición una actividad de precipitación potencial de componentes distintos del ácido nucleico presente en la muestra investigada y la eliminación/disolución del fijador. La liberación puede requerir condiciones como calentamiento o ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU). En una realización de la invención, se introduce una muestra biológica en un cartucho compatible con un sistema automatizado como un analizador de diagnóstico, en el que tienen lugar las etapas de procesamiento de la muestra que implican el contacto con diversas soluciones y la liberación de ácidos nucleicos.

Además, el término "cartucho" debe entenderse como un conjunto autónomo de cámaras y/o canales, que se forma como un solo objeto que se puede transferir o mover como un accesorio dentro o fuera de un instrumento más grande adecuado para aceptar o conectarse a dicho cartucho. Algunas partes contenidas en el cartucho pueden estar firmemente conectadas mientras que otras pueden estar conectadas de manera flexible y móviles con respecto a otros componentes del cartucho. De manera análoga, como se usa en este documento, el término "cartucho de fluidos" se entenderá como un cartucho que incluye al menos una cámara o canal adecuado para tratar, procesar, descargar o analizar un fluido, preferiblemente un líquido. En el documento WO2007004103 se da un ejemplo de dicho cartucho. Ventajosamente, un cartucho de fluidos puede ser un cartucho de microfluidos. En el contexto de los cartuchos de microfluidos, los términos "hacia abajo" y "hacia arriba" pueden definirse en relación con la dirección en la que fluyen los fluidos en dicho cartucho. Es decir, una sección de una trayectoria de fluido en un cartucho desde la que fluye un fluido hacia una segunda sección en el mismo cartucho debe interpretarse como colocada hacia arriba de este último. De manera análoga, la sección a la que llega más tarde un fluido se posiciona hacia abajo con respecto a una sección por la que dicho fluido pasó antes.

En general, como se usa en este documento, los términos "fluido" o, a veces, "microfluido" se refieren a sistemas y disposiciones que se ocupan del comportamiento, control y manipulación de fluidos que están geoméricamente restringidos a una escala pequeña, típicamente submilimétrica en al menos una o dos dimensiones (por ejemplo, ancho y alto o un canal). Estos fluidos de pequeño volumen se mueven, mezclan, separan o bien se procesan a microescala, lo que requiere un tamaño pequeño y un bajo consumo de energía. Los sistemas de microfluidos incluyen estructuras tales como sistemas microneumáticos (fuentes de presión, bombas de líquido, microválvulas, etc.) y estructuras de microfluidos para el manejo de volúmenes de micro, nano y picolitros (canales de microfluidos, etc.). Se han descrito ejemplos de sistemas de microfluidos en los documentos EP1896180, EP1904234 y EP2419705 y, por consiguiente, se pueden aplicar en ciertas realizaciones de la invención presentada en este documento.

#### Breve descripción de las figuras

Para una comprensión más completa de la naturaleza de la presente invención, se hace referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos en los que:

Figura 1: muestra 5 bandas de ADN en un gel electroforético, correspondientes a 5 productos de una qPCR 5plex realizada en una muestra FFPE licuada.

Figura 2: muestra las curvas de amplificación de qPCR para los 5 productos de la qPCR 5plex que se muestra en la Figura 1.

Figura 3: muestra un Cq para copiar el número del histograma de al menos 4 réplicas de cada uno de los productos de qPCR 5plex.

Figura 4: muestra la determinación del valor de R cuadrado para cada uno de los productos de qPCR 5plex.

Figura 5: muestra la capacidad de la qPCR 5plex para distinguir entre diferentes grados de fragmentación de ácidos nucleicos. El panel A muestra los resultados obtenidos de 3 muestras FFPE que tienen ADN relativamente intacto; el Panel B muestra los resultados de otro conjunto de 3 muestras FFPE con un mayor nivel de fragmentación; por último, el Panel C muestra los resultados de 6 muestras FFPE diferentes que contienen ADN muy fragmentado.

Figura 6: muestra los resultados de una qPCR específica de BRAF capaz de discernir entre mutantes de BRAF V600K/R/M y de tipo silvestre, realizada en tres muestras FFPE, cada una de las cuales se enriqueció con un plásmido que contiene una secuencia que codifica para BRAF de tipo silvestre, BRAF mutante V600M o BRAF doble mutante V600K y T149C.

Figura 7: muestra los principios de un tipo de preparación de biblioteca lista para NGS utilizando PCR de biblioteca con cebadores que contienen adaptadores específicos de NGS. Se representan las secuencias de tipo silvestre (Seq ID NO: 1), V600M (Seq ID NO: 2) y V600K + T1794C (Seq ID NO: 3).

Figura 8: muestra los resultados de la NGS realizada en tres muestras FFPE, cada una de las cuales se enriqueció con un plásmido que contiene una secuencia que codifica para BRAF de tipo silvestre, BRAF mutante V600M o BRAF doble mutante V600K y T149C.

Figura 9: muestra un ejemplo de un flujo de trabajo optimizado de muestra a resultado de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación generalmente integra sistemas y métodos basados en qPCR para la evaluación de muestras de ácido nucleico junto con sistemas y métodos para la preparación de bibliotecas de NGS. Dicha integración proporciona un flujo de trabajo de diagnóstico más rápido y eficiente y es particularmente ventajoso para usar la información sobre la calidad del ácido nucleico como se infiere de un proceso de qPCR, directamente para decidir si dicho ácido nucleico es suficientemente adecuado para proceder con un análisis de datos de NGS.

En línea con esto, debido a que se usa exactamente el mismo ácido nucleico procesado de manera idéntica tanto para qPCR como para la preparación de la biblioteca, la presente divulgación también proporciona un medio único para comparar directamente la información de diagnóstico sobre mutaciones diana clave de acuerdo con lo seleccionado por qPCR con un panorama genético más amplio obtenido de los datos de NGS.

En particular, la presente divulgación proporciona un sistema automatizado para el análisis de PCR cuantitativa (qPCR) de un ácido nucleico presente en una fuente de ácido nucleico (por ejemplo, una muestra biológica) recibido en dicho sistema y para la preparación concomitante de una biblioteca de secuenciación de ácidos nucleicos de dicha fuente de ácido nucleico, comprendiendo el sistema:

- un medio para realizar PCR cuantitativa (qPCR) que comprende un compartimento de termociclado de qPCR adecuado para amplificar ácidos nucleicos y que permite la detección de señales generadas durante dicha amplificación, comprendiendo dicho compartimento de termociclado de qPCR los reactivos necesarios para realizar una qPCR;

dicho sistema se caracteriza por

- comprender además un medio para preparar una biblioteca de ácido nucleico que comprende un compartimento de la biblioteca separado del compartimento de termociclado de qPCR, comprendiendo dicho compartimento de la biblioteca reactivos para preparar una biblioteca de ácido nucleico.

Preferiblemente, la qPCR realizada en el compartimento de termociclado de qPCR es una qPCR múltiplex, es decir, una qPCR que amplifica y detecta simultáneamente múltiples secuencias en una única reacción. Una qPCR múltiplex utiliza varios conjuntos de cebadores en una sola mezcla de qPCR y, por lo tanto, genera múltiples productos en un tubo, cámara u otro tipo de compartimento de termociclado de qPCR. La qPCR múltiplex que utiliza dos conjuntos de cebadores (normalmente pares) se denomina dúplex, a menudo denotado como 2plex. De manera similar, una qPCR múltiplex con tres conjuntos de cebadores es una tríplex o 3plex. Las disposiciones de qPCR múltiplex preferidas en la presente invención incluyen una 2plex, una 3plex, una 4plex, una 5plex, una 6plex, una 7plex o más.

Por lo tanto, en una realización preferida, los reactivos necesarios para realizar una qPCR comprenden una pluralidad de conjuntos de cebadores, cada uno dirigido a un amplicón diferente, en el que dicha pluralidad es preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

Es bien sabido en la técnica que diseñar una qPCR múltiplex robusta no es fácil ya que el ensayo requiere que la multiplicidad de conjuntos de cebadores individuales (generalmente pares de cebadores) apunten específicamente a sus amplicones únicos en un tubo de reacción y, por lo tanto, bajo un solo conjunto de condiciones de reacción. El diseño del cebador normalmente tendrá en cuenta la pureza del cebador (de 17 a 30 bases de longitud); equilibrar los dominios ricos en G/C y A/T (20 a 70% de G + C); establecer la temperatura de fusión entre 55-80 °C; evite crear pares de bases complementarios en el extremo 3'; evitar el cebado autocomplementario; y evitar 1 o más C o G en el extremo 3' de los cebadores, especialmente cuando el múltiplex se va a realizar en muestras complejas tales como ADN genómico eucariota. Se encuentran disponibles varias herramientas de software de diseño de cebadores basadas en la web que ayudan a diseñar cebadores de PCR (por ejemplo, Primer3Plus). Otros factores, como la concentración relativa de los cebadores, la concentración correcta de los componentes del tampón de PCR, el equilibrio entre las concentraciones de cloruro de magnesio y desoxinucleótido, las temperaturas de ciclo y la polimerasa de termociclado del ADN, etc. también tienen que ser a menudo afinada para una qPCR múltiplex exitosa. En particular, encontrar una combinación óptima de temperatura de hibridación y concentración de tampón es esencial en la PCR múltiplex para obtener productos de amplificación altamente específicos. La concentración de cloruro de magnesio debe ser proporcional a la cantidad de dNTP, mientras que la concentración de cebador para cada diana debe ser relativamente robusta. La elección de una polimerasa adecuada también puede tener un impacto en el resultado de la reacción. En teoría, la PCR múltiplex se puede realizar con la polimerasa de PCR estándar; sin embargo, en la práctica se prefiere que se utilicen ADN polimerasas altamente procesables y sensibles tales como GoTaq o AmpliTaq. Para aplicaciones particularmente sensibles, modificaciones adicionales de qPCR múltiplex tales como las que usan ADNzimas o MNAzimas pueden ser ventajosas para la aplicación en la presente invención. La lista de los factores aquí mencionados y las estrategias de optimización de multiplexación no debe interpretarse de ninguna manera como extensa, lo que será apreciado inmediatamente por cualquier persona experta en la técnica.

En realizaciones preferidas de la divulgación, la cuantificación de la qPCR en los sistemas y métodos de la invención se basa en el método de curva estándar; sin embargo, también se pueden usar otras estrategias de cuantificación, como apreciará inmediatamente cualquier experto en la materia.

De manera similar, se pueden usar muchos tipos generales diferentes de tintes fluorescentes o sondas de detección

en los sistemas y métodos de la presente invención. En realizaciones preferidas, se usarán sondas específicas de secuencia, por ejemplo, seleccionadas entre sondas de exonucleasa, sondas de hibridación o balizas moleculares. Estas sondas no solo añaden especificidad al ensayo, sino que también son clave para permitir aplicaciones múltiplex. Como se muestra en los ejemplos, los métodos de la invención se aplicaron con éxito con el uso de sondas Taqman, pero también serían adecuadas otras sondas.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se ha observado que una qPCR múltiplex que es particularmente adecuada para evaluar la calidad del ácido nucleico es una qPCR múltiplex que genera amplicones de tamaños variables. El intervalo de tamaño de los amplicones varía desde un tamaño menor  $A_x$  hasta un tamaño mayor  $A_y$  (con  $x < y$ ), típicamente en el intervalo de tamaño de 50-600 pb. Preferiblemente, el tamaño menor de  $A_x$  varía de 50 a 110 pb y puede tener cualquier longitud entre ese intervalo. Preferiblemente,  $A_x$  está entre 60 pb +/- 10 pb. Como se muestra adicionalmente en el presente documento en los Ejemplos,  $A_x$  es de 63 pb o 105 pb. Preferiblemente, el tamaño de  $A_y$  más grande varía de 300 a 550 pb y puede tener cualquier longitud entre ese intervalo. Como se muestra más adelante en los Ejemplos,  $A_y$  es de 504 bp (por ejemplo, para el gen TRFC) o alternativamente de 318 bp (por ejemplo, para el gen de beta-actina). En el caso de la secuenciación de ARN, particularmente en aplicaciones que se centran en microARN (por ejemplo, intervalo de tamaño de 15-35 pb), es posible que sea necesario reducir el intervalo de tamaño de  $A_x$  más pequeño en consecuencia. Como apreciará cualquier experto en la materia, durante el diseño de qPCR múltiplex para los propósitos de la presente invención, los tamaños de amplicón preferidos pueden seleccionarse ventajosamente de acuerdo con la aplicación de NGS de elección para proporcionar la estimación más adecuada sobre la cobertura de NGS de acuerdo con la longitud del amplicón.

En principio, para realizar tal qPCR múltiplex de control de calidad, las dianas pueden seleccionarse de cualquier gen o región genómica. Sin embargo, para el diagnóstico de afecciones genéticamente inestables como el cáncer, es mejor evitar las regiones sensibles a la enfermedad en las que es probable que su secuencia mute o cambie en el número de copias. Por lo tanto, en una realización preferida, las dianas de la qPCR múltiplex de control de calidad se seleccionan de secuencias dentro del exón de genes de copia única, tales como un gen de mantenimiento. Una ventaja adicional de dicha solución es que las mismas secuencias diana dirigidas a regiones dentro del exón pueden usarse en la evaluación tanto del ADN como de la calidad del ARN como material de biblioteca. Debido a lo último, dicho diseño del múltiplex de qPCR múltiplex de control de calidad de la presente invención es particularmente útil cuando se desea secuenciar tanto el genoma como el transcriptoma de una muestra, lo que requiere la construcción y, por lo tanto, también la verificación de la calidad tanto para el ADN como para el ARN. Por tanto, en una realización preferida, la qPCR múltiplex de control de calidad que se va a utilizar en los sistemas y el método de la invención, se dirige al menos a una secuencia dentro del exón en un gen de copia única. Posiblemente, se dirigen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más secuencias dentro del exón en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más genes de copia única. Alternativamente a los genes de mantenimiento, en la construcción de bibliotecas de ADN, las secuencias repetitivas (por ejemplo, LINE, o SINE tales como elementos Alu) pueden ser las dianas de interés. Como ejemplo no limitante mostrado en la sección de ejemplos, los métodos de la invención se practican con éxito en secuencias dentro del exón de los genes de RNAsaP, HPRT1, Beta-Actina, TRFC y ABCB1.

En una realización preferida, el sistema automatizado de acuerdo con la invención comprende además al menos un compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico, situado hacia arriba con respecto al compartimento de termociclado de qPCR y del compartimento de la biblioteca, en el que un usuario puede proporcionar fácilmente (por ejemplo, insertar o verter) una fuente que contiene ácido nucleico, tal como una muestra biológica que desean cribar.

En realizaciones preferidas, la fuente de ácido nucleico es una muestra biológica. Preferiblemente, la muestra es una muestra fresca, una muestra fresca congelada, un aspirado con aguja fina, una muestra que ha sido tratada para su conservación y puede contener entrecruzamiento de sitios reactivos debido al tratamiento de fijación, una muestra en contacto con cera o incluida en cera, una muestra FFPE en forma de rebanada FFPE, una muestra líquida tal como una muestra de orina, una muestra de sangre, una muestra de suero o cualquier otra muestra clínica.

En otra realización altamente compatible con la realización anterior, el sistema automatizado de la invención también comprende un medio para liberar o purificar ácido nucleico de la fuente de ácido nucleico recibida, dicho medio colocado hacia arriba con respecto al compartimento de termociclado de qPCR y del compartimento de la biblioteca y hacia abajo con respecto al compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico y que está en comunicación fluida con el compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico o, alternativamente, comprendido en dicho compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico. Dichos medios pueden comprender cualquier disposición compleja o simple de elementos que realicen funciones que conduzcan a la separación y/o purificación del ácido nucleico de los componentes restantes de la muestra recibida.

Una vez introducidos en los sistemas y métodos de la divulgación, una muestra biológica normalmente se procesará poniéndola en contacto con una composición que proporcione la liberación de ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, la composición está optimizada para su uso en analizadores de microfluidos y preferiblemente contiene tensioactivos en lugar de disolventes orgánicos. La mezcla con dicha composición normalmente facilita el transporte de dicha muestra procesada a través de un sistema de microfluidos. En realizaciones en las que la muestra es una muestra FFPE, el tensioactivo comprendido en dicha composición será preferiblemente no iónico. Los ácidos nucleicos obtenidos de muestras FFPE contienen típicamente enlaces cruzados de nucleótido a nucleótido y de

nucleótido a proteína, modificaciones de bases y otras modificaciones químicas que afectan la integridad del ácido nucleico. Los métodos preferidos de la presente invención incorporan un tensioactivo no iónico y permiten la eliminación automática de la cera incrustada y la liberación de los componentes sin el uso de disolventes orgánicos. Esto es particularmente beneficioso porque coloca a los ácidos nucleicos liberados en una condición y un entorno que interactúa con aplicaciones de escala inferior que requieren actividad enzimática, como la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR. En una realización, el lisado y/o los componentes liberados de la muestra se procesarán adicionalmente en analizadores de diagnóstico que utilizan sistemas de microfluidos.

Opcionalmente, el ácido nucleico liberado se proporciona en una forma suficientemente pura para usarse directamente como plantilla para una qPCR y una construcción de biblioteca de ácidos nucleicos en el sistema automatizado de la invención. En una realización preferida, el medio de liberación de ácido nucleico realiza su función en una disposición fluida o microfluida. En tal caso, los elementos que forman dichos medios liberadores de ácido nucleico pueden comprender una serie de compartimentos consecutivos o interconectados en forma fluida, tal como cámaras o canales, al menos algunos de los cuales se suministran con reactivos como tampones de lisis, soluciones enzimáticas, tampones de extracción, tampones de unión, tampones y/o tampones de lavado; o que comprende opcionalmente cualquiera de las barreras físicas conocidas en la técnica, tales como filtros o resinas de alta afinidad, que facilitan procesos como el aclarado mecánico de muestras o la unión, lavado y liberación de ácidos nucleicos. Tales medios alternativos para liberar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no se discutirán en este documento con mayor detalle.

En otra realización ventajosa, el sistema automatizado comprende además medios para dividir la fuente de ácido nucleico recibida, o el ácido nucleico liberado o purificado de dicha fuente, entre al menos el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca. Tales medios podrían, por ejemplo, comprender dos canales separados que se extienden desde el compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico o el compartimento en el que se deposita el ácido nucleico liberado de dicha fuente en la última etapa del proceso de liberación de ácido nucleico, en el compartimento de termociclado de qPCR y en el compartimento de la biblioteca, respectivamente. Para transportar activamente el ácido nucleico entre los compartimentos de elección, el sistema automatizado de la invención podría proporcionar un gradiente de presión capaz de empujar o halar de una cantidad deseada de fluido en la dirección prescrita. La generación de tales gradientes de presión por medio de bombas, dispositivos de succión, colectores, etc. se emplea ampliamente en los sistemas de microfluidos contemporáneos y, por lo tanto, es bien conocida en la técnica.

En otra realización preferida, el sistema automatizado de la invención comprende más de un compartimento de termociclado de qPCR, cada uno de los cuales está físicamente separado del compartimento de la biblioteca, en el que cada uno de los compartimentos de termociclado de qPCR comprende los reactivos necesarios para realizar una qPCR y es adecuado para amplificar ácidos nucleicos y permitir la detección de señales generadas durante dicha amplificación. En tal realización, el segundo y el consiguiente compartimento de termociclado de qPCR se pueden usar preferiblemente para seleccionar marcadores específicos de elección.

La presente divulgación proporciona preferiblemente sistemas basados en cartuchos. Por tanto, en otro aspecto, se proporciona un sistema automatizado en el que uno o más compartimentos de termociclado qPCR y el compartimento de la biblioteca, preferiblemente también el compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico y los medios para liberar ácido nucleico de la fuente de ácido nucleico recibida, están comprendidos en un cartucho que puede acoplarse con dicho sistema automatizado, preferiblemente un cartucho de fluidos o de microfluidos.

Los cartuchos de microfluidos adecuados para los propósitos de la presente invención son conocidos en la técnica. Preferiblemente, tales cartuchos pueden contener al menos dos cámaras de reacción que comprenden el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca, y una o más cámaras de fluido. Algunas de las cámaras de fluido pueden contener fluido que se utiliza para producir lisado a partir de la muestra. Otras cámaras pueden contener líquidos tales como líquidos de lavado y solución de amplificación. Se utilizan cámaras de reacción separadas como compartimento de termociclado de qPCR y compartimento de la biblioteca. La cámara configurada para servir como compartimento de termociclado de qPCR comprende varios conjuntos de cebadores, junto con otros reactivos de amplificación y enzimas necesarios para realizar una qPCR. La otra cámara configurada para servir como compartimento de la biblioteca está adaptada para realizar las etapas de construir una biblioteca de ácido nucleico para una aplicación de NGS de elección. Partes de la muestra se transferirán a las cámaras de reacción y para hacer posible dicha transferencia, las cámaras se conectarán a uno o más canales de fluido. En al menos uno, pero preferiblemente en cada uno de estos canales de fluido, se puede proporcionar un medio de válvula, cuyo medio de válvula preferiblemente cierra normalmente el canal de fluido, pero abre el canal de fluido tras accionar el medio de válvula con el mismo colocando las dos cámaras respectivas en comunicación fluida. Los medios de válvula pueden diseñarse como una válvula unidireccional.

En otra realización ventajosa, la presente invención también proporciona un sistema automatizado, en el que los medios para realizar la qPCR están adaptados para, es decir, comprenden todos los componentes necesarios para realizar cualquiera de los siguientes:

- qPCR de control de calidad (QC) adecuada para evaluar la calidad del ácido nucleico sometido a la misma; o
- qPCR múltiplex no de calidad adecuada para determinar la presencia o cantidad de alteraciones genómicas potencialmente presentes en el ácido nucleico sometido a las mismas.

Además, se proporciona un sistema automatizado, en el que la qPCR de QC es una qPCR múltiplex de QC y en el que el sistema automatizado comprende además un medio para generar una salida métrica de calidad a partir de los datos obtenidos de dicha PCR múltiplex de QC. Tal salida de métrica de calidad puede caracterizar el ácido nucleico que se utilizará para fabricar la biblioteca o el ácido nucleico a partir de la propia biblioteca después de que dicha biblioteca ya se haya elaborado en el compartimento de la biblioteca. Por tanto, en posibles realizaciones, el sistema automatizado de la invención puede comprender además medios para transferir una parte del ácido nucleico de la biblioteca preparada en el compartimento de la biblioteca.

En una realización particularmente preferida, el sistema automatizado de la invención es capaz de operar el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca de forma simultánea o secuencial. Esto significa que se pueden prever tres modos de funcionamiento: (i) ambos compartimentos funcionan una vez que se alimenta el ácido nucleico en ellos, por lo que la preparación de la biblioteca es independiente de la qPCR y se desarrolla en paralelo; y (ii) primero, se hace qPCR, luego se crea la biblioteca; así, la decisión de preparar una biblioteca para la secuenciación se toma una vez que se conocen los resultados de la qPCR y puede depender de estos resultados; (iii) primero, se crea la biblioteca, luego se realiza la qPCR en la biblioteca para la verificación de la calidad de la biblioteca.

La opción (i) anterior describe la operación simultánea en la que la preparación de una biblioteca para NGS a partir de una parte de una muestra de ácido nucleico se realiza simultáneamente con un ensayo de qPCR en otra parte de la misma muestra de ácido nucleico, y ambos son preferiblemente realizados en paralelo en un sistema de microfluidos basado en cartucho. Como se usa en el presente documento, el término "simultáneamente" o "en paralelo" se refiere a suceder o realizarse al mismo tiempo. En tal disposición, la qPCR se realiza en una parte de una muestra de ácido nucleico al mismo tiempo que se construye la biblioteca de ácidos nucleicos para la aplicación de NGS a partir de otra parte de la misma muestra de ácido nucleico. En otras palabras, durante la operación simultánea, tanto el análisis de la muestra mediante qPCR como la construcción de la biblioteca son ejecutados por el sistema automatizado de la invención al mismo tiempo.

Por el contrario, las opciones (ii) y (iii) anteriores pueden describirse ambas como operando "secuencialmente". En una posible realización de la operación secuencial, al menos dos compartimentos de termociclado de qPCR operan en el sistema automatizado de la invención. Por ejemplo, se puede realizar la primera qPCR para leer la expresión de marcadores interesantes y verificar la calidad de la fuente de ácido nucleico introducida en el sistema. Después de esta primera qPCR (secuencialmente), o para ahorrar tiempo en paralelo con dicha primera qPCR (simultáneamente), se construye una biblioteca. Luego, se puede realizar una segunda qPCR de control en la biblioteca así construida para verificar si su calidad es suficiente para someterla a aplicaciones adicionales, tales como secuenciación.

Con respecto a la preparación o construcción de la biblioteca de secuenciación, actualmente existen muchas formas diferentes de generar una biblioteca lista para la secuenciación, y su elección depende naturalmente de qué estrategia de NGS se pretende realizar. En general, la generación de bibliotecas de NGS implica la generación de fragmentos de ácido nucleico, que son compatibles con NGS dadas. Por tanto, en una realización preferida, se proporciona un sistema automatizado en el que el compartimento de la biblioteca comprende medios para generar fragmentos de ácido nucleico a partir del ácido nucleico recibido en dicho compartimento de la biblioteca.

Para la mayoría de las plataformas NGS disponibles comercialmente, es necesaria la amplificación de los fragmentos de ácido nucleico para generar suficientes copias de las plantillas de secuenciación. Por tanto, preferiblemente, los fragmentos de ácido nucleico se generan en una PCR, también denominada "PCR de biblioteca". Las PCR de bibliotecas adecuadas se conocen en la técnica e incluyen métodos tales como amplificación en puente o PCR en emulsión.

Con mayor frecuencia, los fragmentos de ácido nucleico que forman una biblioteca lista para secuenciación contienen adaptadores de oligonucleótidos específicos de la plataforma NGS. Dichos adaptadores pueden incorporarse en los fragmentos de ácido nucleico mediante ligación o mediante PCR. En una realización particular de acuerdo con lo anterior, el compartimento de la biblioteca comprende medios para unir adaptadores de oligonucleótidos a al menos uno, preferiblemente ambos extremos de los fragmentos de ácido nucleico. Ventajosamente, los fragmentos de ácido nucleico se generan en una biblioteca de PCR y en la que la unión de adaptadores de oligonucleótidos a dichos fragmentos de ácido nucleico se realiza incluyendo una secuencia adaptadora en una secuencia de al menos un cebador usado en dicha biblioteca de PCR.

Las bibliotecas de NGS que contienen fragmentos de ácido nucleico se pueden obtener a partir de una fuente de ácido nucleico de interés, tal como ADN genómico, ADNc bicatenario y amplicones de PCR. La presencia de secuencias adaptadoras permite la amplificación clonal selectiva de las moléculas de la biblioteca.

Como ya se indicó anteriormente, la construcción de bibliotecas de ácidos nucleicos es necesaria para la

secuenciación de ADN, secuenciación de ARN y otras aplicaciones tales como análisis de metilación basado en secuenciación. La secuenciación de ARN (RNA-seq) es un método para investigar el transcriptoma de un organismo mediante técnicas de secuenciación profunda. El ARN total generalmente contiene solo un porcentaje muy pequeño de ARN codificante o funcional; el ARN ribosómico (ARNr: hasta un 80-90% del ARN total) y, en menor grado, el ARN de transferencia (ARNt), constituyen la mayor parte del ARN de una muestra. A menudo, para no utilizar el 80-90% de la capacidad de secuenciación de una capacidad de secuencia en secuencias de ARNr repetitivas, el ARNr se puede eliminar de la muestra antes de la secuenciación. El ARN después de la eliminación del ARNr se convierte en una biblioteca. Esto implica la creación de ADNc de doble cadena a través de la transcripción inversa del ARN (o ARN fragmentado). Este ADNc de doble cadena se puede manipular luego como ADN genómico normal durante todo el proceso de construcción de la biblioteca restante, incluido el enlace con adaptadores específicos de la estrategia de NGS apropiada.

En otro aspecto, se proporciona un sistema automatizado que comprende además un compartimento de recuperación para recuperar cualquiera de los siguientes:

- una parte de la fuente de ácido nucleico recibida en el sistema automatizado;
- una parte del ácido nucleico liberado, liberado en el sistema automatizado;
- al menos una parte de la biblioteca de ácidos nucleicos preparada en el sistema automatizado.

Dicho compartimento de recuperación puede comprender o simplemente estar hecho de otra cámara en la que no tiene lugar ninguna reacción durante el funcionamiento del sistema de la invención. Preferiblemente, dicha recuperación sería fácilmente accesible desde fuera del presente sistema automatizado o desde un cartucho del sistema automatizado. Por ejemplo, podría comprender una pared hecha de un material perforable (por ejemplo, una lámina o una película) que puede perforarse con una aguja de una jeringa o una pipeta, permitiendo la aspiración de su contenido. Alternativamente, el compartimento de recuperación podría ponerse selectivamente en comunicación fluida y llenarse con cualquiera de los anteriores mediante el bombeo y siguiendo las instrucciones dadas por el usuario a través de una interfaz del sistema automatizado de la invención.

En una posible realización, tal compartimento de recuperación podría ser un contenedor externo, por ejemplo, un tubo de plástico o un vial, acoplable o conectable al sistema automatizado de la invención. En tal caso, cualquiera de los compartimentos siguientes:

- el compartimento que aloja al menos una parte de la fuente de ácido nucleico recibida en el sistema automatizado o al menos una parte del ácido nucleico liberado de dicha fuente;
- el compartimento de la biblioteca;
- compartimento de termociclado de qPCR;

podría comprender una estructura (por ejemplo, una extensión tal como un canal o una zona acoplable con un elemento que forma un canal) capaz de mantenerlo en comunicación fluida con el compartimento de recuperación por cualquier medio capaz de transportar al menos una parte del contenido comprendido en cualquiera de dichos compartimentos enumerados anteriormente en los compartimentos de recuperación.

En una realización ventajosa, el compartimento de la biblioteca puede comprender una estructura capaz de ponerlo en comunicación fluida directamente con un compartimento en el que se realiza la NGS, posiblemente en el que dicho compartimento está comprendido en otro sistema, un sistema tal como un secuenciador automático.

En un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método ventajoso para realizar un análisis de qPCR con una preparación de biblioteca concomitante. En un enfoque convencional, las muestras de ácido nucleico se someten primero a etapas de control de calidad y solo después de que se conocen los resultados de estas etapas, dichas muestras se utilizan para la generación de la biblioteca de secuenciación. En tal procesamiento consecutivo, los ácidos nucleicos se almacenan durante una cierta cantidad de tiempo antes de que se conozcan los resultados, período durante el cual pueden estar sujetos a degradación. Por tanto, a pesar de estar caracterizado como adecuado para la preparación de bibliotecas en el ensayo de control de calidad anterior, una muestra de ácido nucleico en el momento en que se utiliza para la construcción de bibliotecas ya puede tener una calidad disminuida después de por ejemplo, demasiados ciclos de descongelación-congelación u otros errores durante el almacenamiento. En algunos casos, particularmente aplicable al ARN, esto incluso puede conducir a una falla de la NGS. Además, un enfoque consecutivo es laborioso, requiere mucho tiempo y conlleva el riesgo de mezclar datos de diferentes muestras. La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente proporcionando un método que comprende la etapa de realizar una qPCR de control de calidad concomitantemente con la etapa de construir una biblioteca adecuada para NGS usando la misma muestra de ácido nucleico en el mismo sistema automatizado. Preferiblemente, estas dos etapas se realizan en un cartucho que encaja en un sistema de microfluidos basado en cartuchos.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método para realizar qPCR con una preparación concomitante de una biblioteca de ácidos nucleicos en el sistema automatizado de acuerdo con la invención, en el que dicho sistema comprende al menos un compartimento de termociclado de qPCR y un compartimento de la biblioteca separado de dicho al menos un compartimento de termociclado de qPCR, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) recibir una fuente de ácido nucleico en el sistema automatizado, comprendiendo dicha fuente de ácido nucleico

ácido nucleico;

b) liberar o purificar en dicho sistema automatizado el ácido nucleico de al menos una parte de dicha fuente recibida de ácido nucleico;

5 c) realizar qPCR sobre el ácido nucleico liberado o purificado de la fuente de ácido nucleico, comprendiendo dicha qPCR termociclar dicho ácido nucleico en un compartimento de termociclado de qPCR comprendido en dicho sistema y adecuado para amplificar ácidos nucleicos y permitir la detección de señales generadas durante dicha amplificación;

d) preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el compartimento de la biblioteca comprendido en dicho sistema; en el que las etapas c) y d) se realizan en dicho sistema automatizado de forma secuencial o simultánea.

10 Preferiblemente, se proporciona un método en el que las etapas c) y d) se realizan en dicho sistema automatizado en un cartucho extraíble. Lo más preferiblemente, se proporciona un método en el que las etapas a) a d) se realizan en dicho sistema automatizado en un cartucho.

15 En una realización preferida del método de la invención, la etapa d) comprende una etapa de realización de PCR, también denominada "PCR de biblioteca".

20 Como se explicó anteriormente, uno de los aspectos de la divulgación implica ejecutar la qPCR de control de forma concomitante con la preparación de una biblioteca para NGS, en la que ambos procedimientos usan ácido nucleico de la misma fuente (muestra), preferiblemente ácido nucleico liberado a partir de una muestra clínica. En una realización preferida, ambos procedimientos se realizan en un cartucho, siendo preferiblemente un cartucho de microfluidos acoplable con un aparato de tipo analizador de modo que el cartucho sea una plataforma desechable autónoma para realizar las etapas del método de acuerdo con la presente invención. En tal realización ventajosa, todos los reactivos requeridos para realizar el método de la invención se colocan previamente dentro de dicho cartucho, por consideraciones de almacenamiento, preferiblemente en una forma seca o liofilizada.

25 Por tanto, en otra realización preferida, la presente divulgación también proporciona un cartucho para el sistema automatizado de acuerdo con la invención, en el que dicho cartucho comprende:

30 - al menos un compartimento de termociclado de qPCR que comprende los reactivos necesarios para realizar una qPCR; y

- al menos un compartimento de la biblioteca separado del compartimento de termociclado de qPCR, comprendiendo dicho compartimento de la biblioteca los reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos.

En una realización preferida, dicho cartucho también comprendería

35 - al menos un compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico y preferiblemente también medios para liberar ácido nucleico de la fuente de ácido nucleico recibida; y

- medios para dividir la fuente de ácido nucleico recibida o el ácido nucleico liberado de dicha fuente entre al menos el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca, y preferiblemente también

- identificador específico del cartucho para la identificación automática de cartuchos o pacientes.

40 Preferiblemente, dicho cartucho se puede integrar en una plataforma de automatización de mayor rendimiento que presenta un enfoque integrado de "entrada de muestra, salida de biblioteca de ácido nucleico de calidad comprobada". En este sentido, las métricas de calidad del ácido nucleico medidas dentro del compartimento de termociclado de qPCR se suministrarán junto con la biblioteca de ácidos nucleicos para su uso en NGS. Basándose en la salida de la métrica de calidad, la biblioteca de ácidos nucleicos se puede seleccionar o deseleccionar en un sistema automatizado de la invención para someterla posteriormente a una aplicación de NGS.

45 La presente divulgación proporciona una automatización eficaz del flujo de trabajo con las diferentes etapas desde la entrada de muestra hasta la salida de métrica. El enfoque presentado en este documento tiene un gran potencial para proporcionar tiempos de respuesta mínimos, menores costes y mejores tasas de éxito de NGS. Esto último hace que los sistemas, métodos y cartuchos automatizados de la invención sean particularmente adecuados para el uso con muestras desafiantes como las muestras FFPE. Esto último se debe al menos en parte al hecho de que el enfoque de la presente invención minimiza la variabilidad observada entre procesos consecutivos realizados en la misma muestra después de períodos de almacenamiento prolongados y, por lo tanto, permite evaluar más correctamente el estado del ácido nucleico antes de la construcción de la biblioteca de NGS.

55 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas para la invención de acuerdo con se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso de los términos "que incluye", "incluye" o "incluido" no es limitativo.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Desarrollo de una qPCR de QC para una evaluación automatizada de salida de la muestra de ácidos nucleicos

En primer lugar, se desarrolló un ensayo de qPCR de control de calidad (QC) con el fin de evaluar la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos presentes en una muestra de una manera totalmente automatizada. Las presentes pruebas de qPCR de QC para determinar la presencia de amplicones de varias longitudes, cada uno derivado de un gen humano de copia única diferente, y sirve para evaluar la idoneidad del ácido nucleico para la aplicación de NGS. Los amplicones y sus longitudes son los siguientes: (1) fragmento de 63 pb del gen RNAsaP humano; (2) fragmento de 105 pb de HPRT; (3) fragmento de 149 pb de TFRC; (4) fragmento de 213 pb de ABCB; y (5) fragmento de 318 pb de  $\beta$ -actina. La amplificación de los fragmentos en una reacción de PCR (5plex) se verificó inicialmente utilizando una qPCR realizada en una muestra FFPE licuada (muestra FFPE de Horizon) con una polimerasa GoTaq y sondas Taqman (composición de acuerdo con lo especificado por el proveedor). El programa de qPCR se mantuvo en 5' a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 5" a 95 °C, 44" a 64 °C. La Figura 1 muestra los fragmentos obtenidos (carril izquierdo) junto a una escalera de ADN (carril derecho) en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con verde de SYBR después de la electroforesis en TBE. El correspondiente perfil de qPCR de la misma muestra que se muestra en la Figura 2 (tamaños de amplicones indicados junto a las curvas correspondientes). Los valores de Cq determinados con el algoritmo de regresión contenido en el Biorad CFX Manager 3.1 son: (1) 26,1 para el fragmento de 63 pb (RNAsaP); (2) 25,6 para el fragmento de 105 pb (HPRT); (3) 26,0 para el fragmento de 149 pb (TFRC); (4) 26,2 para el fragmento de 213 pb (ABCB); y (5) 27,4 para el fragmento de 318 pb ( $\beta$ -actina).

A continuación, se evaluó el rendimiento de 5plex sobre ADN genómico humano no fragmentado para obtener curvas estándar con valores de R cuadrado para cada uno de los 5 amplicones. Para ello, se utilizó como sustrato ADN genómico humano no fragmentado a razón de 173  $\mu$ g/ml (Promega) y se dedujo el número de copias utilizando como premisa 3,3 pg/genoma haploide. Cuatro réplicas a razón de 24000 copias por PCR, 4 réplicas a razón de 6000 copias, 8 réplicas a razón de 1500 copias, 8 réplicas a razón de 375 copias, 12 réplicas a razón de 94, 16 réplicas a razón de 23 copias, 20 réplicas a razón de 5,9 copias y 24 réplicas a razón de 1,5 copias por PCR se amplificaron y se determinaron las Cq como se describió anteriormente. Los valores de la mediana de Cq se determinaron omitiendo la ausencia de amplificaciones (las denominadas líneas planas). El histograma que representa este experimento se muestra en la Figura 3. Las curvas estándar se dedujeron para cada amplicón mediante regresión logarítmica y el valor de R cuadrado se determinó como se ejemplifica en la Figura 4 para el conjunto de datos completo y el conjunto de datos sin los valores de Cq de 5,9 y 1,5 copias por PCR, respectivamente. Como era de esperar, los valores de R cuadrado se acercan mejor a 1 con solo puntos de datos en un número de copia de dos dígitos. Para valores de Cq por debajo de 34, se utilizaron las ecuaciones con los valores de R cuadrado más altos. En particular, para valores de Cq superiores a 34, se sabe que la cuantificación es menos precisa debido a los efectos estocásticos. Los números de copia así calculados de acuerdo con dichas ecuaciones de cada uno de los 5 amplicones permiten la determinación tanto del contenido de ADN útil como del grado de fragmentación del ácido nucleico en una muestra dada. Un análisis del coeficiente de dirección de la regresión lineal entre  $\log_2$  (entrada del número de copias) y Cq proporciona una indicación adicional de la eficiencia de amplificación en qPCR 5plex de cada uno de los amplicones. Como se conoce en la técnica, se supondría que una qPCR perfecta duplicaría la cantidad de amplicón (y por lo tanto también la fluorescencia neta de Taqman) por ciclo, dejando un coeficiente de dirección absoluto de 1. De acuerdo con esto, como se muestra en la Figura 4, los coeficientes de dirección absolutos para todos los amplicones excepto para el amplicón más grande de 318 pb son 0,9 o más, lo que indica una amplificación robusta cercana a duplicar la degradación de la sonda Taqman por ciclo de PCR. El tamaño de amplicones más grande muestra un coeficiente de dirección absoluto  $> 0,8$ , lo que indica que el fragmento más grande se amplifica más lentamente y que no tiene mucho sentido diseñar una prueba de PCR de QC con amplicones más largos para este tipo de ensayo basado en la sonda Taqman.

Ejemplo 2. Procesamiento automatizado de muestras FFPE, evaluación de la calidad del ácido nucleico, detección de marcadores accionables por la diana y construcción de bibliotecas

Con el fin de demostrar la viabilidad de la presente invención, se preparó un conjunto de cartuchos Biocartis Idylla, cada cartucho ubicado en cámaras de PCR separadas: (i) reactivos para realizar la qPCR 5plex de QC descrita anteriormente, (ii) reactivos para realizar la qPCR diana para detectar BRAF de tipo silvestre y mutante V600M/R, y (iii) reactivos para construir una biblioteca de ADN compatible con el secuenciador Illumina MiSeq. A continuación, un conjunto de muestras FFPE para analizar en dichos cartuchos se enriquecieron con plásmidos que codifican BRAF humano. Para simular la realidad clínica, se utilizaron diferentes secuencias de BRAF, incluido un fragmento que contiene una secuencia de BRAF de tipo silvestre (wt), un fragmento que codifica una mutación V600M y un fragmento que codifica dos mutaciones V600K y T149C. Los dos fragmentos mutados se enriquecieron en diferentes cantidades con respecto a la cantidad de copias de tipo silvestre presentes en las muestras FFPE para obtener una concentración relativa del 10% y 5%, respectivamente. Cada una de las diferentes muestras FFPE enriquecidas con BRAF se introdujo en un cartucho separado y se procesó de forma totalmente automática en el instrumento Biocartis Idylla. En resumen, el procesamiento implicó la licuefacción de la muestra (como se describe, por ejemplo, en el documento WO2014128129), seguida de la purificación del ácido nucleico en una membrana de sílice incluida en el cartucho, y luego seguida de tres reacciones de PCR independientes y controladas individualmente realizadas en paralelo, que incluyeron: (i) verificación de la calidad de los ácidos nucleicos purificados mediante qPCR 5plex de QC, como se describió anteriormente; (ii) detección en tiempo real de dianas de BRAF seleccionadas (qPCR para mutaciones accionables por diana); y (iii) construcción de una biblioteca de ADN utilizando cebadores de cebado aleatorio estándar o específicos de BRAF que comprenden enlazadores compatibles con el secuenciador Illumina MiSeq. La última PCR

de construcción de biblioteca se realizó utilizando una polimerasa de inicio en caliente de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs) y se cicló de acuerdo con el siguiente programa: 5' a 95 °C y 50 ciclos de 90" a 60 °C, 5" a 94 °C.

La Figura 5 muestra los resultados de la qPCR 5plex de QC sobre las diferentes muestras FFPE, que proporcionan información con respecto a la integridad del ADN presente en dichas muestras. El panel A muestra tres ejemplos de muestras de tejido FFPE que contienen ADN relativamente intacto. El panel B muestra otros tres ejemplos que tienen un grado ligeramente mayor de fragmentación del ADN. Por último, el Panel C muestra 6 ejemplos de muestras de tejido FFPE que contienen ADN muy fragmentado, lo que es una contraindicación para someter dichas muestras a análisis adicionales por NGS.

Con base en los resultados de la qPCR 5plex de QC, se seleccionaron tres muestras con ADN relativamente intacto y que contenían tres formas diferentes de BRAF enriquecido (wt, mutante V600M o mutante doble V600K + T149C) para investigación adicional. En primer lugar, se comprobaron los resultados obtenidos del ensayo de qPCR capaz de detectar BRAF de tipo silvestre y la mutación de BRAF V600M para confirmar la presencia de la forma BRAF correcta. Los resultados con respecto a la Figura 6. Demuestran que en todas las tres muestras FFPE seleccionadas, se pudo detectar la señal de Wt BRAF (Figura 6, columna de la izquierda, el término "diana" se refiere a la secuencia de Wt BRAF). Se esperaba este resultado ya que se sabía que todas las muestras FFPE antes de la adición con diferentes plásmidos de BRAF contenían una secuencia genómica de BRAF wt. Con respecto a la detección del mutante V600M (Figura 6, columna de la derecha, el término "diana" se refiere a la secuencia de BRAF V600M/K), como se esperaba, en la muestra enriquecida solo con el plásmido que codifica BRAF wt, no se pudo detectar ningún mutante V600M (Figura 6, panel superior derecho; línea de señal plana para la diana). Sin embargo, en las muestras FFPE enriquecidas con el mutante V600M o el mutante doble V600K + T149C, la mutación V600M se detectó correctamente en las cantidades esperadas (Figura 6, columna derecha, panel inferior y medio). Debido a que la qPCR específica de BRAF usada aquí no incluía una sonda específica para la mutación T1794C, dicha mutación no pudo detectarse en la muestra enriquecida con BRAF doble mutante.

### Ejemplo 3. Secuenciación de las bibliotecas de NGS seleccionadas

Para confirmar los resultados de la qPCR específica de BRAF y para detectar también la presencia de la mutación T1794C no detectada, las bibliotecas de NGS construidas a partir de las mismas tres muestras de plásmido FFPE seleccionadas (wt, V600M o V600K y T149C) se sometieron a secuenciación de Illumina MiSeq. La PCR de la biblioteca utilizada para construir estas bibliotecas se muestra esquemáticamente en la Figura 7 y, como se mencionó anteriormente, se realizó en los mismos cartuchos y en paralelo con la PCR 5plex de QC y la qPCR de ensayo específico de BRAF. La biblioteca de PCR incluyó 50 ciclos y utilizó cebadores de fusión específicos de BRAF simplificados (también conocidos como cebadores de cola). Los cebadores de fusión (mostrados en el panel central de la Figura 7) además de la secuencia específica de la diana (BRAF) también contenían la secuencia del cebador de secuenciación y una etiqueta (P5 y P7) para la unión de la celda de flujo. Además, el cebador inverso también contenía un código de barras (o un índice) que durante un ciclo de secuenciación permite discernir entre muestras obtenidas de diferentes fuentes. La razón para introducir dicho código de barras es que, por lo general, las bibliotecas construidas a partir de diferentes muestras o pacientes se agrupan y secuencian en el mismo instrumento de NGS. Por tanto, para diferenciar entre bibliotecas obtenidas de las tres muestras FFPE diferentes, cada cartucho contenía un cebador inverso ligeramente diferente que tenía una secuencia de código de barras única.

Antes de la secuenciación, las tres bibliotecas de NGS se recuperaron de los respectivos cartuchos usando una jeringa con aguja, después de lo cual las muestras se agruparon y purificaron más en la mesa de trabajo para eliminar los cebadores y los dímeros de cebadores que no habían reaccionado. Cabe señalar que la última etapa de purificación también se puede realizar automáticamente. Finalmente, las bibliotecas de NGS purificadas se cargaron en una celda de flujo del instrumento MiSeq Illumina y se secuenciaron.

Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura 8. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente de la qPCR específica de BRAF, en la primera muestra que contenía solo BRAF de tipo silvestre no se detectaron mutaciones. Para las otras dos muestras, todas las mutaciones del gen BRAF esperadas se identificaron correctamente durante la secuenciación, incluso si no se pudieron capturar en la qPCR específica de BRAF. En particular, la NGS no solo detectó la mutación T1794C de BRAF perdida en la qPCR específica de la diana, sino que también permitió discriminar entre las mutaciones V600M y V600K en muestras FFPE enriquecidas con mutante y mutante doble, respectivamente, proporcionando así una identificación aún más exacta de las mutaciones ya detectadas. Los presentes resultados demuestran la solidez sin precedentes de la presente invención, en la que los resultados deseados no solo se proporcionan de una manera rápida y eficiente, sino que también se pueden seguir con éxito a voluntad si se desea una comprensión más profunda.

Para una apreciación más completa de la presente invención, el flujo de trabajo descrito anteriormente se ilustra esquemáticamente en la Figura 9. Comienza proporcionando una muestra FFPE en un cartucho, después de lo cual las etapas subsiguientes hasta la obtención de los resultados finales de qPCR (tanto de qPCR de QC como de qPCR con marcador accionable por la diana, aquí BRAF) y la biblioteca lista para usar se llevan a cabo de forma totalmente automatizada y de manera rápida (se proporcionan marcos de tiempo real). Cabe señalar que todos estos resultados y la biblioteca se obtienen de la misma muestra procesada de manera idéntica, lo que garantiza una alta

comparabilidad de los datos de diferentes ensayos. En particular, mediante la construcción concomitante de la biblioteca de NGS y la provisión de información con respecto a la calidad de dicha biblioteca, el presente enfoque no solo permite someter rápidamente una muestra determinada a un seguimiento clínico de NGS, sino que también permite decidir si un seguimiento tan costoso es factible en vista de la calidad de esa muestra. En vista de lo anterior, la presente invención abre nuevas posibilidades en la práctica de diagnóstico actual.

5

Listado de secuencias

- 10 <110> Biocartis NV  
 <120> Secuenciación optimizada de muestras clínicas  
 <130> BCT-069
- 15 <150> EP15178159.8  
 <151> 2015-07-23  
 <160> 3
- 20 <170> BiSSAP 1.3.6  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Seq ID No: 1 - Tipo silvestre
- 30 <400> 1  
 agctacagtg a 1  
 <210> 2  
 <211> 11
- 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Seq ID No: 2 V600M
- 40 <400> 2  
 agctacaatg a 11  
 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Seq ID No: 3 V600K-T1794C
- 50 <400> 3  
 agccacaag a 11

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema automatizado para el análisis de PCR cuantitativa (qPCR) de un ácido nucleico presente en una fuente de ácido nucleico, tal como una muestra biológica, recibido en dicho sistema y para la preparación concomitante de una biblioteca de secuenciación de ácido nucleico a partir de dicha fuente de ácido nucleico, comprendiendo el sistema:
- un cartucho;
  - medios para realizar PCR cuantitativa (qPCR) que comprenden un compartimento de termociclado de qPCR adecuado para amplificar ácidos nucleicos y que tiene una pared transparente a la luz que permite la detección de señales generadas durante dicha amplificación, comprendiendo dicho compartimento de termociclado de qPCR los reactivos necesarios para realizar una qPCR; y
  - medios para preparar una biblioteca de ácido nucleico que comprende un compartimento de la biblioteca que comprende reactivos para preparar una biblioteca de ácido nucleico;
- en el que el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca están ambos comprendidos como compartimentos separados en el cartucho; y  
 en el que el sistema está configurado para realizar el análisis de PCR cuantitativo y la preparación de la biblioteca de ácidos nucleicos simultáneamente operando concomitantemente el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca.
2. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además dicho sistema:
- al menos un compartimento receptor de fuente de ácido nucleico y preferiblemente también medios para liberar o purificar ácido nucleico de la fuente de ácido nucleico recibida; y
  - medios para dividir la fuente de ácido nucleico recibida o el ácido nucleico liberado o purificado de dicha fuente entre al menos el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca.
3. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico y los medios para liberar ácido nucleico están comprendidos en el cartucho.
4. Sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios para realizar qPCR están adaptados para realizar cualquiera de los siguientes:
- qPCR de control de calidad (QC) adecuado para evaluar la calidad del ácido nucleico sometido a la misma; o
  - qPCR múltiplex no de calidad adecuada para determinar la presencia o cantidad de alteraciones genómicas potencialmente presentes en el ácido nucleico sometido a la misma.
5. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la qPCR de QC es una qPCR múltiplex de QC y en el que el sistema automatizado comprende además un medio para generar una salida métrica de calidad a partir de los datos obtenidos de dicha PCR múltiplex de QC.
6. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en el que los medios para realizar una qPCR comprenden al menos dos pares de cebadores, en el que el primer par de cebadores está adaptado para generar un primer amplicón dentro de un intervalo de tamaño de 50 a 110 pb, y en el que el segundo par de cebadores está adaptado para generar un segundo amplicón que tiene un tamaño mayor que el primer amplicón y preferiblemente está dentro de un intervalo de tamaño de 300 a 550 pb.
7. Sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compartimento de la biblioteca comprende medios para generar fragmentos de ácido nucleico a partir del ácido nucleico recibido en dicho compartimento de la biblioteca.
8. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los medios para generar fragmentos de ácido nucleico comprenden cebadores para realizar una PCR, denominada además dicha PCR como "PCR de biblioteca".
9. Sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el compartimento de la biblioteca comprende medios para unir adaptadores de oligonucleótidos a al menos uno, preferiblemente ambos extremos de los fragmentos de ácido nucleico.
10. Sistema automatizado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la unión de adaptadores de oligonucleótidos a los fragmentos de ácido nucleico se realiza incluyendo una secuencia adaptadora en una secuencia de al menos un cebador usado en la biblioteca de PCR.
11. Sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además dicho sistema un compartimento de recuperación para recuperar cualquiera de los siguientes:

- una parte de la fuente de ácido nucleico recibida en el sistema automatizado;
- una parte del ácido nucleico liberado, liberado en el sistema automatizado;
- al menos una parte de la biblioteca de ácido nucleico preparada en el sistema automatizado.

5 12. Un método para realizar qPCR con una preparación concomitante de una biblioteca de ácidos nucleicos en el sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) recibir una fuente de ácido nucleico en el sistema automatizado;
- 10 b) liberar o purificar en dicho sistema automatizado el ácido nucleico de al menos una parte de dicha fuente recibida de ácido nucleico;
- 15 c) realizar qPCR sobre el ácido nucleico liberado o purificado de la fuente de ácido nucleico, comprendiendo dicha qPCR termociclar dicho ácido nucleico en un compartimento de termociclado de qPCR comprendido en dicho sistema y adecuado para amplificar ácidos nucleicos, comprendiendo dicho compartimento de termociclado qPCR al menos una pared transparente a la luz que permite la detección de señales generadas durante dicha amplificación;
- 15 d) preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en un compartimento de la biblioteca comprendido en dicho sistema;

20 en el que el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca están ambos comprendidos como compartimentos separados en un cartucho acoplable con el sistema automatizado, y en el que las etapas c) y d) se realizan en dicho sistema automatizado simultáneamente.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que las etapas a) a d) se realizan en dicho sistema automatizado en el cartucho.

25 14. Un cartucho para el sistema automatizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, el cartucho definido como un conjunto autónomo de cámaras y canales y formado como un solo objeto adaptado para ser transferido o movido como un accesorio dentro o fuera de un instrumento más grande adecuado para aceptar o conectarse a dicho cartucho, comprendiendo el cartucho:

- 30 - al menos un compartimento de termociclado de qPCR que comprende los reactivos necesarios para realizar una qPCR y que comprende al menos una pared transparente a la luz; y
- al menos un compartimento de la biblioteca, comprendiendo dicho compartimento de la biblioteca los reactivos necesarios para preparar una biblioteca de ácido nucleico, en el que el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca están comprendidos ambos como compartimentos separados en el cartucho y están
- 35 configurados para ser operados simultáneamente por el sistema automatizado.

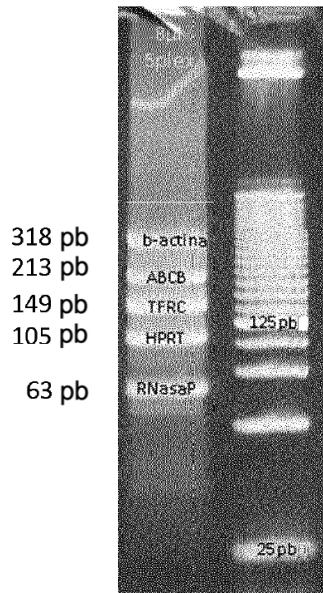
15. Un cartucho de acuerdo con la reivindicación 14, comprendiendo además el cartucho

- 40 - al menos un compartimento receptor de la fuente de ácido nucleico y preferiblemente también medios para liberar ácido nucleico de la fuente de ácido nucleico recibida; y
- medios para dividir la fuente de ácido nucleico recibida o el ácido nucleico liberado de dicha fuente entre al menos el compartimento de termociclado de qPCR y el compartimento de la biblioteca, y preferiblemente también

un identificador específico del cartucho.

**SECUENCIACIÓN OPTIMIZADA DE UNA MUESTRA CLÍNICA**

**Figura 1**



**Figura 2**

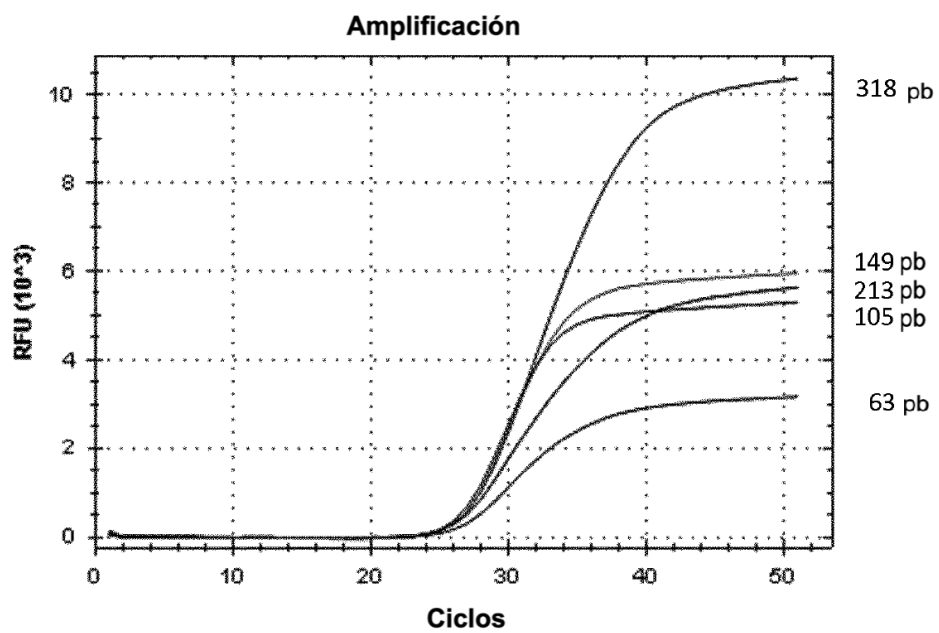


Figura 3

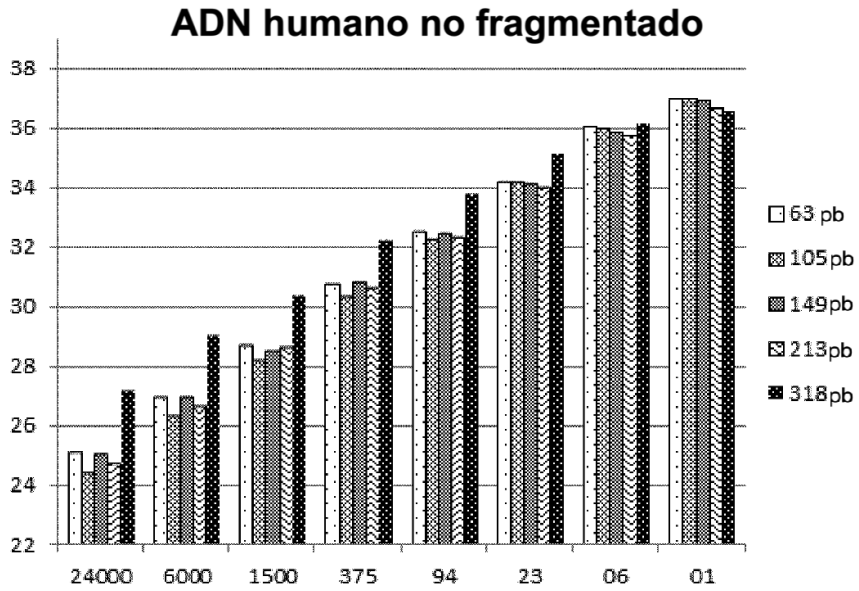


Figura 4

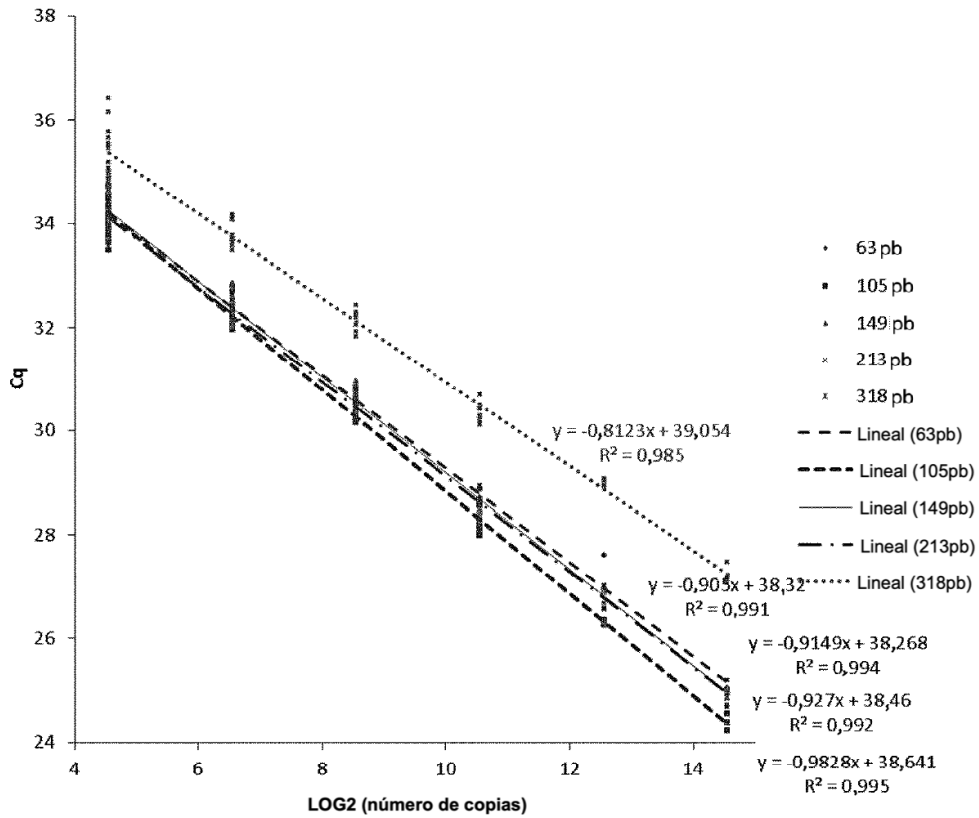


Figura 5

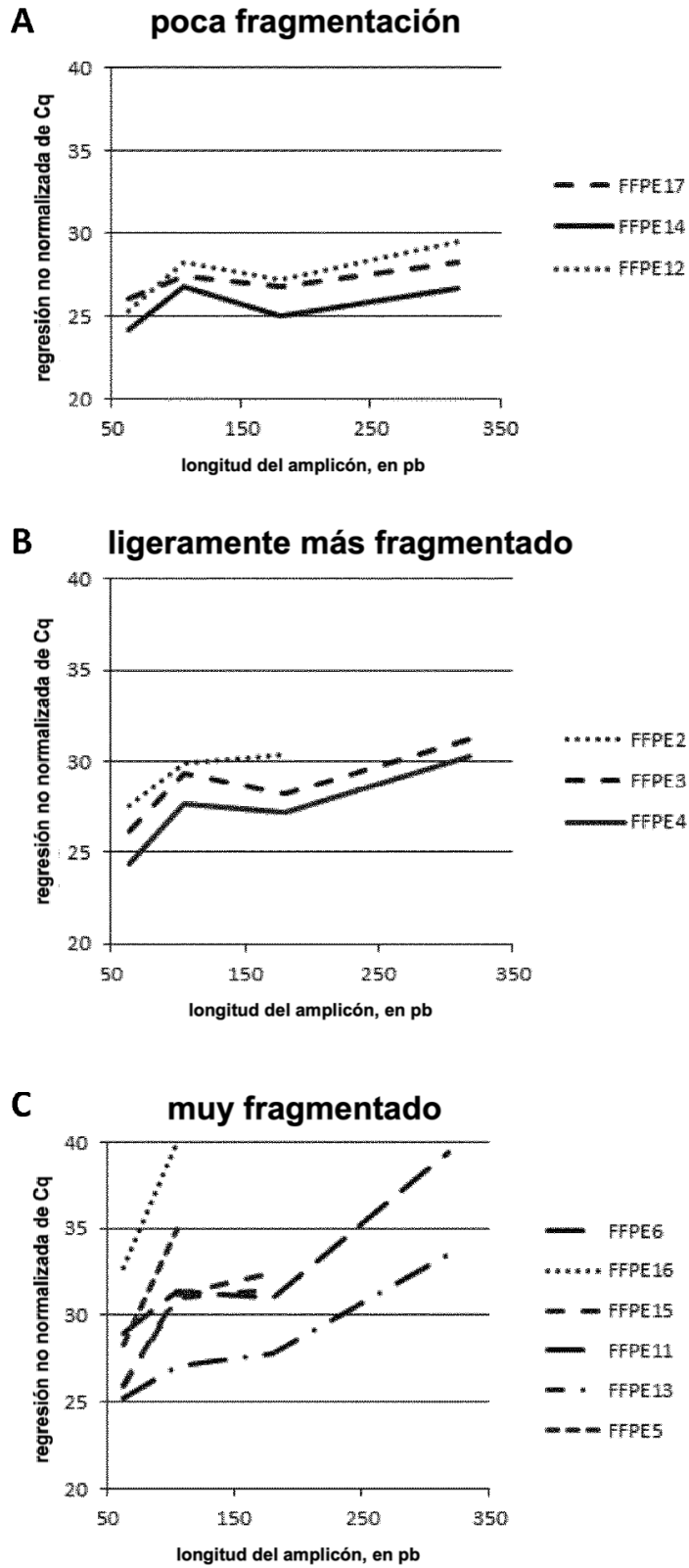


Figura 6

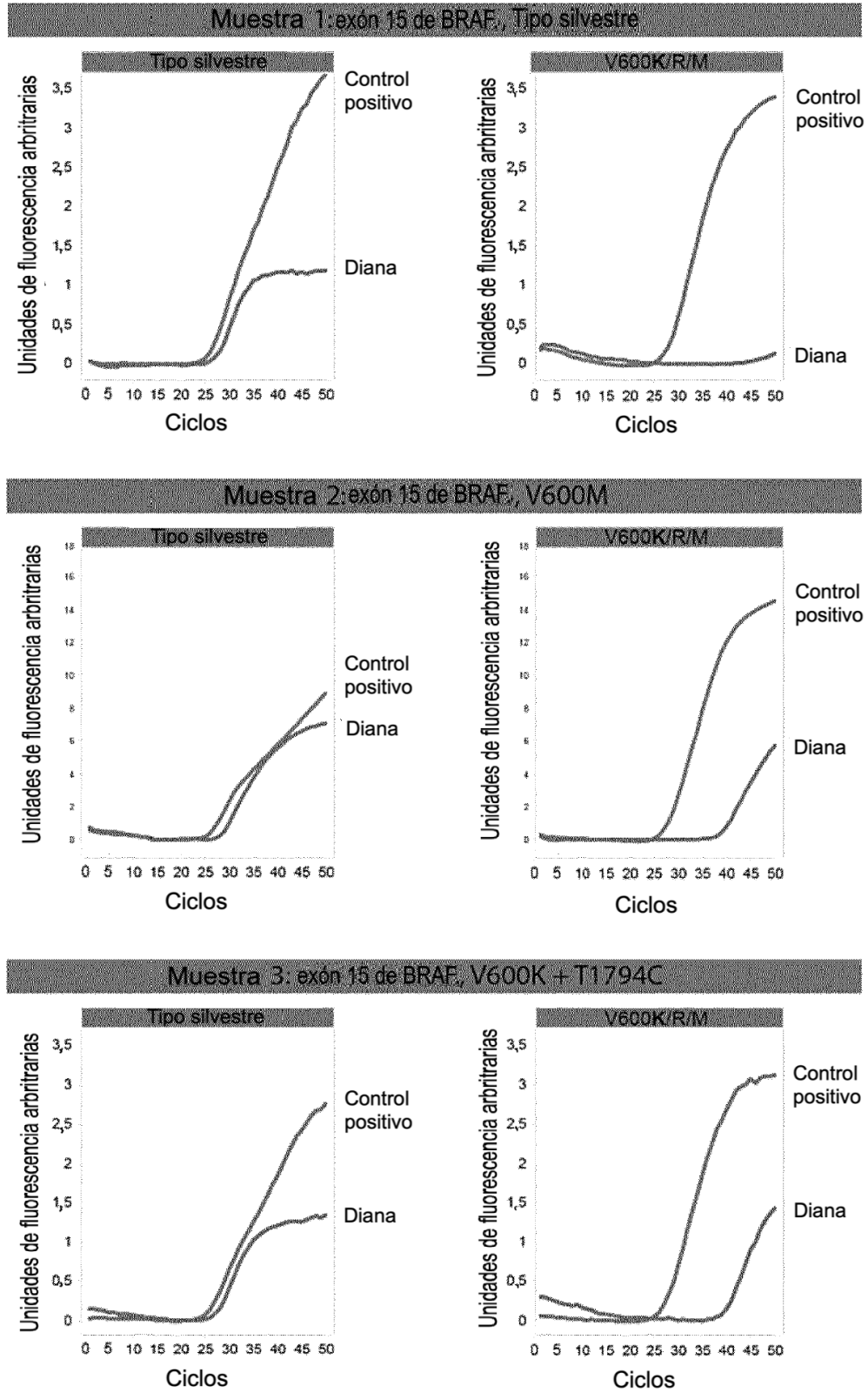


Figura 7

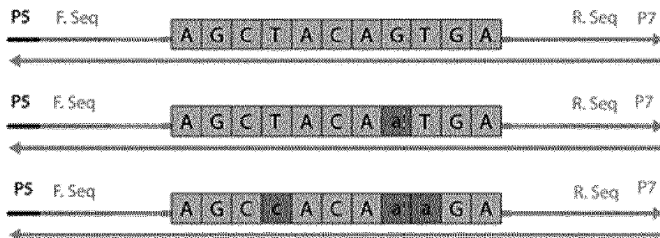
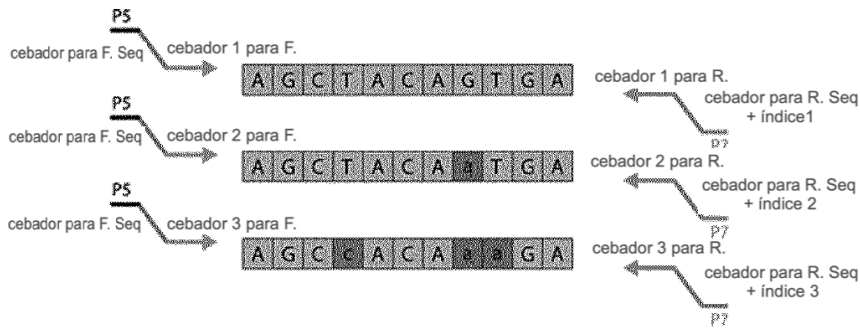
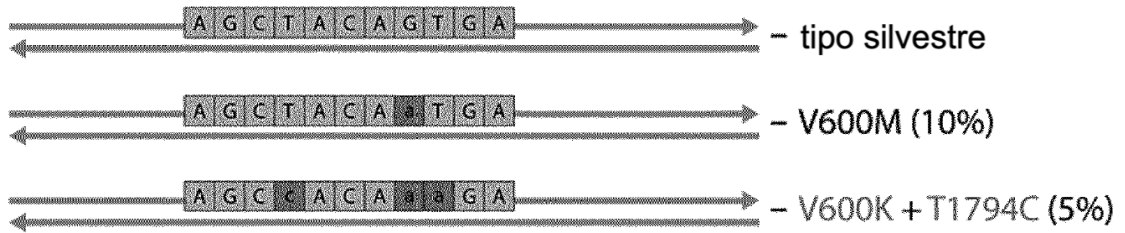


Figura 8

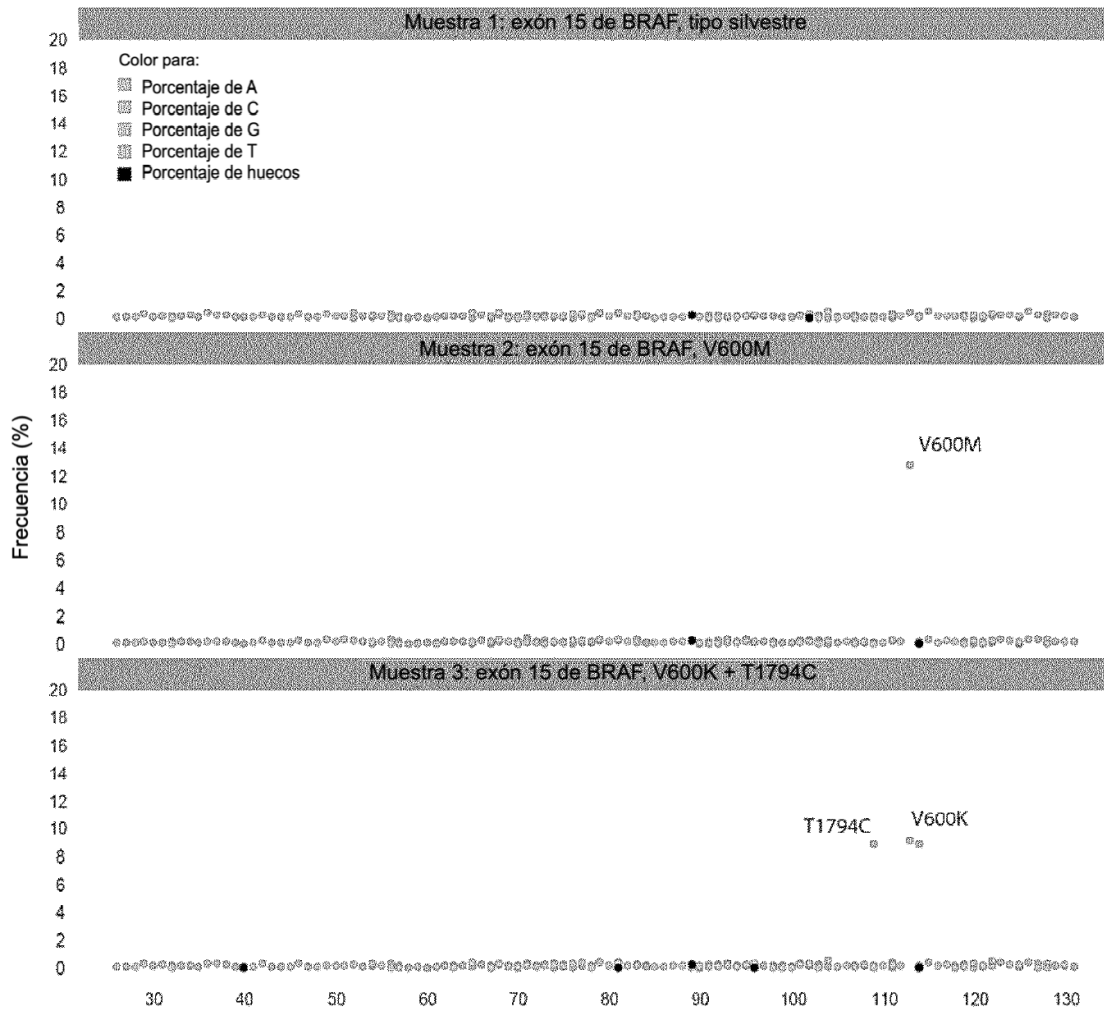


Figura 9

