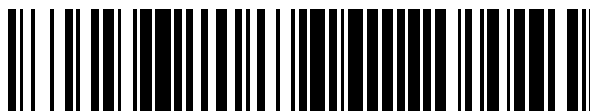


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 907**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2019** **E 19156182 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020** **EP 3693086**

54 Título: **Método de manipulación de microgotitas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.07.2021

73 Titular/es:

LIGHTCAST DISCOVERY LTD (100.0%)
Broers Building, 21-22 J J Thomson Avenue
Cambridge CB3 0FA, GB

72 Inventor/es:

ISAAC, THOMAS HENRY;
BALMFORTH, BARNABY;
CONTERIO, JASMIN;
JOHNSON, KERR FRANCIS;
SOSNA, MACIEJ;
INGHAM, RICHARD y
PODD, GARETH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 841 907 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 manipulación de microgotitas

Esta invención se refiere a un método mejorado de manipulación de microgotitas acuosas que contienen opcionalmente células biológicas en un fluido portador inmiscible, tal como un aceite. Permite controlar o ajustar el tamaño de las microgotitas y mantener u optimizar cualquier reacción enzimática o química que se produzca en ellas durante un período determinado.

En nuestras solicitudes de patente anteriores, por ejemplo WO2014167323, WO2015121675, WO2016012789, WO2017140839 y PCT/EP2018066574, hemos descrito métodos en los que componentes biológicos tales como células, enzimas, oligonucleótidos e incluso nucleótidos individuales se manipulan dentro de microgotitas con el fin de llevar a cabo una gama de análisis que incluyen la secuenciación de ADN y ARN y la detección y caracterización de células y virus. Los documentos US2015/247192, US2007/241068 y US2017/175179 proporcionan antecedentes tecnológicos. En algunas realizaciones, estos métodos implican trasladar microgotitas dispersas en un fluido portador inmiscible a lo largo de vías microfluídicas en un dispositivo analítico usando fuerzas propulsoras de electrohumectación o imprimiendo directamente las microgotitas sobre un sustrato revestido con el fluido portador. En muchos casos, donde la fracción de volumen de las microgotitas es relativamente baja, hemos encontrado que estas microgotitas tienden a sufrir una contracción significativa con el tiempo, lo que a veces puede interferir con algunos o todos los procesos enzimáticos que tienen lugar en su interior. Además, en otros casos, puede ser deseable reducir o aumentar deliberadamente el tamaño de las microgotitas en una parte de un dispositivo a medida que se lleva a cabo un análisis dado.

Ahora hemos desarrollado un método de manipulación de microgotitas que supera estos problemas. Puede usarse, por ejemplo, para manipular el tamaño y/o la reactividad del contenido de microgotitas o para controlar reacciones químicas o enzimáticas que ocurren en ellas. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método genérico para controlar el tamaño de microgotitas y/o mantener u optimizar las reacciones enzimáticas o químicas que ocurren en las mismas, teniendo dichas microgotitas un volumen promedio en el rango de 0.5 femtolitros a 10 nanolitros compuesto de al menos un componente biológico y un primer medio acuoso que tiene una actividad de agua de a_{w1} de menos que 1 caracterizado por el paso de mantener las microgotitas en un fluido portador inmiscible en agua que incluye además gotitas secundarias de un segundo medio acuoso que tiene un volumen promedio menor del 25% del volumen medio de las microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen de fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1. Sin desear limitar el alcance de la invención, se cree que la invención resuelve el problema mediante el uso de un fluido portador que contiene gotitas secundarias muy pequeñas que pueden interactuar con las microgotitas sin afectar negativamente las características generales de estas últimas o la eficacia de cualquier método de detección. aplicado a ellos. Cuando el medio portador es un aceite, a veces se hace referencia a dicho medio compuesto como "aceite hidratado". Una característica importante a este respecto es que las actividades relativas del agua de las microgotitas y las gotitas secundarias se controlan dentro de ciertos parámetros; opcionalmente mediante monitorización continua y/o un bucle de retroalimentación. Aquí, la actividad del agua de un medio acuoso (a_w) se define como la relación entre la presión de vapor parcial del medio acuoso bajo investigación y la del agua pura en condiciones STP. Dado que el agua tiende a difundirse a lo largo de un gradiente de actividad de agua alta a baja, hemos encontrado que, dentro de las limitaciones de nuestros sistemas, cuando la actividad de agua del segundo medio acuoso (a_{w2}) es mayor que la del primer medio acuoso (a_{w1}) el efecto neto es que las microgotitas se expanden hasta que las actividades del agua de los dos componentes se igualan. Por el contrario, cuando la actividad del agua del segundo medio acuoso es inferior que la del primer medio acuoso, las microgotitas tenderán a contraerse hasta que estas actividades del agua se igualen. En una realización útil, las actividades de agua del primer y segundo medio acuoso pueden ser iguales o sustancialmente iguales de modo que cualquier tendencia de las microgotitas a contraerse o expandirse se contrarresta continuamente. Por tanto, siempre se pueden conservar los tamaños de las microgotitas. También hemos descubierto que, por estos medios, estas gotitas secundarias pueden usarse para ayudar a preservar o incluso mejorar cualquier reacción enzimática o química que se produzca en las microgotitas; por ejemplo, utilizando las gotitas secundarias para alimentar componentes de crecimiento celular a las microgotitas en uno o más puntos en cualquier dispositivo que emplee el método. El primer y segundo medio acuoso pueden tener composiciones que en una realización son idénticas.

Por tanto, en una realización de la invención, la actividad de agua del primer y segundo medio acuoso está independientemente en el rango de 0.9 a 1. En otra realización, la actividad de agua del primer medio acuoso es de 0.9 a menos que 1. En otra realización más, la relación de las actividades del agua del primer y segundo medio acuoso ($a_{w1}:a_{w2}$) está en el rango de 0.9:1 a 1:0.9.

Una forma conveniente de realizar la manipulación es usar un primer y segundo medio que son reguladores; y, si es necesario, variando las composiciones relativas de los dos. Por ejemplo, en una aplicación, la fuerza iónica del primer medio acuoso está en el rango de 1 a 5 que la del segundo medio acuoso; preferiblemente de 3 a 5 veces. En otro, la fuerza iónica del segundo medio acuoso está en el rango de 1 a 5 veces la del primer medio acuoso; preferiblemente de 3 a 5 veces. En otra aplicación más, las fuerzas iónicas son las mismas o sustancialmente las mismas, estando la relación de fuerzas iónicas en el rango de 3:1 a 1:3. En una realización particularmente útil, uno o ambos medios

acuosos primero y segundo pueden incluir glicerol como componente; por ejemplo, a diferentes concentraciones. En otro, los pH del primer y segundo medio acuoso son iguales o similares y están dentro del rango de 6.5 a 8.

En cuanto a las gotitas secundarias, estas tienen un volumen medio mucho menor que el valor medio de las microgotitas y en el límite pueden estar compuestas por gotitas o micelas del tamaño de una femto del segundo medio acuoso emulsionadas dentro del fluido portador y estabilizadas por una funda de moléculas surfactantes compatibles; por ejemplo, un surfactante no iónico. En una realización, el tamaño de estas gotitas secundarias es menos del 10%, preferiblemente menos del 5% del volumen de las microgotitas empleadas. En otro, el volumen medio de las gotitas secundarias se encuentra dentro del rango del 10 a 1% del volumen medio de las microgotitas. Adecuadamente, las gotitas secundarias forman parte de una emulsión estable en el fluido portador que en una realización es un aceite inmiscible. De forma adecuada, el fluido portador se selecciona de un aceite mineral, un aceite de silicona o un aceite fluorocarbonado. El aceite también puede contener surfactantes y estabilizadores adicionales si es necesario. De forma adecuada, la relación de volumen de fluido portador al volumen total de las microgotitas es mayor que 3:1; preferiblemente 5:1 o mayor.

El método de la invención es útil para varias aplicaciones en las que se analizan células biológicas. Un ejemplo es cuando se hace que un cultivo de células de mamífero inmortalizadas prolifere dentro de las microgotitas con el fin de seleccionar copias clonales individuales de las células en busca de características deseables tales como expresión de proteínas o rasgos genéticos particulares. Así, en un segundo aspecto de la invención, en una realización se proporciona un método para provocar la proliferación celular de uno o más tipos de células contenidos dentro de una microgotita que tiene un volumen promedio en el rango de 4 femtolitros a 10 nanolitros y que comprende un regulador acuoso que comprende los pasos de incubar las células dentro de las gotitas en condiciones ambientales adecuadas y luego detectar el número de células dentro de cada gotita, caracterizado porque las microgotitas están suspendidas en un fluido portador inmiscible que además comprende gotitas secundarias que tienen un volumen promedio menor que 25% del volumen medio de las microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen de fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.

En otra realización, también se proporciona un método para detectar uno o más rasgos fenotípicos, rasgos genéticos o perfiles de expresión de proteínas de una célula en consideración, estando contenida esa célula dentro de una microgotita que tiene un volumen promedio en el rango de 4 femtolitros a 10 nanolitros y compuesta por un medio de crecimiento acuoso que comprende los pasos de marcar un objetivo derivado de las células con una sonda fluorescente y luego detectar una salida de la sonda caracterizada porque las microgotitas que contienen células están suspendidas en un fluido portador inmiscible que comprende además gotitas secundarias que tienen un volumen medio menor al 25% del volumen medio de las microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen del fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1. Las moléculas de sonda fluorescentes adecuadas para este propósito son bien conocidas e incluyen anticuerpos marcados con fluorescencia, sondas indicadoras de FRET y antígenos marcados con enzimas que se degradan en presencia de una proteína objetivo.

En otra realización, se proporciona un método para analizar un oligonucleótido derivado de una célula biológica contenida dentro de una microgotita que tiene un volumen promedio en el rango de 4 femtolitros a 10 nanolitros y que además comprende un regulador acuoso que comprende los pasos de marcar el oligonucleótido con una sonda de hibridación fluorescente y luego detectando la fluorescencia correspondiente caracterizado porque las microgotitas se suspenden en un fluido portador inmiscible que comprende además gotitas secundarias que tienen un volumen promedio menor al 25% del volumen promedio de las microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros y en donde la relación de volumen de fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.

Las sondas de hibridación fluorescentes que pueden usarse para este propósito son bien conocidas en la técnica e incluyen balizas moleculares, sondas TaqMan®, sondas Scorpion® y sondas LNA®. Los métodos para detectar la fluorescencia que surge en todas estas realizaciones son bien conocidos por un experto en la técnica; por ejemplo, aquellos métodos que emplean una fuente de radiación electromagnética incidente (láser, LED y similares) y un fotodetector correspondiente para detectar fotones de fluorescencia y emitir un flujo de datos que se puede analizar usando algoritmos de microprocesador.

Por tanto, el objetivo en estos métodos puede ser las células mismas, uno o más oligonucleótidos derivados de ellos o un producto tal como una proteína que es expresada por las células cuando se cultiva dentro de la propia microgotita. Tales oligonucleótidos pueden generarse a partir de las células por lisis.

El método de la invención también puede emplearse adecuadamente en conexión con componentes biológicos que no son celulares o están libres de células, aunque en una realización puede usarse para manipular ácidos nucleicos o componentes de los mismos que se han derivado previamente de células biológicas. Por tanto, en un tercer aspecto de la invención se proporciona un método para manipular el tamaño y/o la reactividad del contenido de microgotitas que tienen un volumen medio en el rango de 0.5 femtolitros a 10 nanolitros; las microgotitas están compuestas por al menos un componente biológico y un primer medio acuoso libre de células biológicas que tienen una actividad de agua de a_{w1} menor a 1 caracterizado por el paso de mantener las microgotitas en un fluido portador inmiscible en agua que además incluye gotitas secundarias comprendidas de un segundo acuoso y que tiene un volumen promedio menor

al 25% del volumen promedio de las microgotitas hasta un máximo de 0.5 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen de fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.

El método del tercer aspecto de la invención es útil para un número de aplicaciones en las que el componente biológico es un solo nucleótido; por ejemplo, un trifosfato de un solo nucleósido o un monofosfato de un solo nucleósido. Por ejemplo, el método puede usarse ventajosamente con uno de los métodos de secuenciación que hemos descrito anteriormente, incluidos, entre otros, los descritos en el documento EP3013987 o en las otras solicitudes de patente mencionadas anteriormente a las que se dirige el lector. Por tanto, en un tercer aspecto, se proporciona un método de secuenciación que comprende los pasos de digerir progresivamente mediante pirofosforólisis un analito de ácido nucleico en una corriente ordenada de moléculas de nucleósido trifosfato y generar a partir de ella una corriente ordenada correspondiente de microgotitas que tienen un volumen promedio en el rango 0.5 femtolitros a 10 nanolitros y cada uno compuesto por una de las moléculas de nucleósido trifosfato y regulador acuoso; haciendo reaccionar cada molécula de nucleósido trifosfato dentro de cada microgotita con una sonda fluorescente específica de la nucleobase y luego detectando la fluorescencia correspondiente asociada con cada microgotita identificando así la nucleobase caracterizada porque las microgotitas están suspendidas en un fluido portador inmiscible que además comprende gotitas secundarias que tienen un volumen promedio menor del 25% del volumen medio de las microgotitas hasta un máximo de 0.5 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen de fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.

Las sondas fluorescentes adecuadas para su uso en esta solicitud han sido descritas por nosotros en nuestras solicitudes de patente anteriores; por ejemplo, WO2016012789 y aplicaciones posteriormente publicadas a las que se dirige el lector. Estas sondas se caracterizan por (a) no ser fluorescentes en su estado no utilizado y (b) ser capaces de sufrir exonucleólisis una vez utilizadas para producir fluoróforos en un estado detectable unidos a monofosfatos de un solo nucleósido. La fluorescencia que surge puede detectarse y analizarse como se describe anteriormente.

En todos estos aspectos adicionales de la invención se prefiere que la relación de las actividades de agua del primer y segundo medio acuoso asociado con las microgotitas y las gotitas secundarias, respectivamente, esté en el rango de 0.9:1 a 1:0.9; preferiblemente de 0.95: 1 a 1: 0.95 y por ejemplo 1:1.

El efecto ventajoso de hidratar la fase portadora como se describe anteriormente se ilustra ahora mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 (crecimiento celular)

El material en fase oleosa continua se prepara mezclando 99 partes de una fase continua de hidrofluoroéter con 1 parte de un surfactante fluorado. Se prepara una fase portadora tratada con medio de crecimiento mezclando una alícuota de medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) con un volumen igual de la mezcla de aceite/surfactante y agitando la mezcla durante 24 horas a 37°C para formar una emulsión polidespersa. Esta emulsión luego se deja reposar hasta que se fracciona espontáneamente para formar una fase superior que comprende gotitas grandes y tapones no dispersos de medio de crecimiento acuoso, y una fase inferior que contiene solo las vesículas más pequeñas de medio de crecimiento suspendidas en la fase oleosa que además ahora está saturada con medios acuosos disueltos. Esta fase inferior se retira del recipiente con una pipeta y se retiene para su uso posterior.

Se suspenden células de linfoma de células T Jurkat E6-1 (ATCC, Virginia, E.U) en medio RPMI a una concentración de células 8E6/ml. Este medio y las células se hacen fluir luego a través de un aparato emulsionante para formar gotitas de 50 µm de diámetro, con las células dispersas por todas las gotitas. La fase portadora externa de la emulsión es un aceite de hidrofluoroéter mezclado con un 1% de un surfactante adecuado para estabilizar las gotitas en solución. La emulsión así formada se fracciona espontáneamente para formar una capa de gotitas acuosas monodispersas densamente empaquetadas que flotan en la parte de arriba de una columna de mezcla continua de aceite/surfactante. A continuación, esta emulsión se dispersa uniformemente mediante mezcla suave y se divide en tres alícuotas que contienen gotitas y la fase portadora.

Una alícuota (la referencia inicial) se transfiere inmediatamente a una célula de flujo de hemocitómetro y las gotitas en la misma se inspeccionan usando un microscopio óptico de aumento de 20x. La ocupación celular de cada gotita se registra contando el número de células distintas en cada gotita. Se descartan las gotitas vacías.

La segunda alícuota se deja fraccionar una vez más y la fase portadora inferior se retira usando una pipeta. Se introduce en la muestra un volumen equivalente de la fase portadora tratada anteriormente para reemplazar la fase portadora no tratada eliminada. La tercera alícuota no se modifica. A continuación, tanto la segunda como la tercera alícuotas se transfieren a recipientes parcialmente sellados que permiten la penetración de gas entre el recipiente y sus alrededores. Ambos recipientes se colocan en una incubadora de CO2 controlada por el medio ambiente configurada para contener una mezcla de aire/CO2 al 5%, humedad del 95% y temperatura establecida de 37°C. Las alícuotas se incuban durante 24 horas.

A continuación, estas alícuotas se extraen de la incubadora y se introducen en un hemocitómetro para su inspección y análisis de la misma forma que la alícuota de referencia. El cambio en la distribución de la población celular después

de la incubación (característica de la proliferación celular) se puede comparar entre los diferentes tratamientos con aceite.

La figura 1 compara los resultados obtenidos después de 24 horas de cultivo relativamente con la medición de la línea base a cero y 24 horas sin hidratación del aceite. El crecimiento celular se expresa aquí como una fracción de las gotitas que contienen más de una célula. Se verá que, relativamente con el crecimiento celular inicial, se produce una mejora cuando el aceite se hidrata con el medio de cultivo celular.

Ejemplo 2 (reactividad)

Se prepara una fase oleosa hidratada continua mezclando 99 partes de un aceite mineral ligero con 1 parte de un surfactante pegilado en peso. El aceite se coloca en un rotor durante la noche para mezclar completamente el aceite y el surfactante. El aceite hidratado se prepara mezclando 5 partes del aceite con 3 partes de la fase de hidratación acuosa, que consiste en el mismo regulador salino usado en la fase de emulsión dispersa o solo agua. La mezcla se hace girar durante la noche a 50°C y luego durante 60 min a 70°C. La emulsión se deja reposar durante 15 min. La porción superior de la emulsión se divide en alícuotas, y las alícuotas se centrifugan para ajustar el nivel de hidratación del aceite, con tiempos de centrifugación más largos que conducen a niveles de hidratación inferiores. El nivel de hidratación se mide usando un valorador Karl Fisher. Una vez que se alcanza el nivel de hidratación correcto, generalmente 500-1000ppm, el sobrenadante de las alícuotas se pipetea en tubos nuevos que se congelan hasta su uso.

Se produce una emulsión polidispersa de gotitas mezclando 8 partes del aceite (hidratado o no hidratado) con 1 parte de la fase acuosa dispersa en volumen seguido de mezcla en un mezclador vórtex durante 5 min y centrifugación durante 1 min a 400 RPM. La mitad superior de la mezcla se pipetea en un tubo nuevo que se centrifuga durante 5s. La emulsión se pipetea desde la parte de abajo del tubo para su uso posterior.

Para las mediciones de la actividad enzimática, la fase acuosa dispersa descrita anteriormente consiste en la química de detección de un solo nucleótido como se describió previamente y se ejemplificó en EP3013987.

Para medir la intensidad fluorescente, la emulsión se intercala entre dos sustratos transparentes separados por espaciadores correspondientes al tamaño medio de las gotitas de emulsión. La señal fluorescente emitida por cada gotita de emulsión, tras la excitación con luz de un rango de longitud de onda apropiado, se mide junto con el diámetro de la gotita que se recoge de una imagen de campo claro de la emulsión.

Los datos presentados como histograma en la figura 2 muestran la intensidad fluorescente promedio de gotitas de 6µm, que se han incubado en aceite sin hidratación ('aceite seco'), en aceite hidratado con agua ('solo agua') o aceite hidratado con tres veces la concentración de regulador de las gotitas ('regulador 3x'). Las gotitas incubadas en aceite sin hidratación muestran una intensidad muy baja por encima del fondo que para estas muestras es de aproximadamente 1000 conteos. Las incubadas en aceite hidratadas con agua muestran una mayor intensidad en comparación con las gotitas incubadas en aceite sin hidratación. La incubación de gotitas en aceite hidratado con tres veces la concentración de regulador muestra un aumento adicional en la intensidad media. Esto demuestra que tanto la hidratación del aceite se puede utilizar para mantener la reactividad enzimática en estas gotitas.

Ejemplo 3 (efecto de tamaño de gotita)

Las microgotitas se depositan sobre un sustrato sumergido en una fase oleosa continua como, por ejemplo, se describió previamente en el documento EP3008207 al que se dirige el lector.

La fase oleosa hidratada continua se prepara mezclando 99 partes de aceite de parafina con 1 parte de un surfactante pegilado en peso. El aceite se coloca en un rotor durante la noche para mezclar completamente el aceite y el surfactante. El aceite hidratado se prepara mezclando 5 partes del aceite con 3 partes de la fase acuosa hidratante, que consiste en agua con o sin 4% de glicerol. La mezcla se hace girar durante la noche a 50°C y luego durante 60 min a 70°C. La emulsión se deja reposar durante 15 min. La porción superior de la emulsión se divide en alícuotas, y las alícuotas se centrifugan para ajustar el nivel de hidratación del aceite, con tiempos de centrifugación más largos que conducen a niveles de hidratación inferiores. El nivel de hidratación se mide usando un valorador Karl Fisher. Una vez que se alcanza el nivel de hidratación correcto, generalmente 500-1000ppm, el sobrenadante de las alícuotas se pipetea en tubos nuevos que se congelan hasta su uso.

La fase acuosa dispersa consiste en agua con o sin 4% de glicerol. Las gotitas depositadas se someten a un ciclo de incubación a 70°C durante 115 min. A continuación, se miden los diámetros de las gotitas de emulsión a partir de una imagen de microscopio de campo claro y se comparan con los diámetros medidos antes del ciclo de incubación para inferir la contracción o el crecimiento de las gotitas.

Los datos presentados a continuación muestran el cambio de volumen medio de las gotitas en un paso de incubación a alta temperatura en función del porcentaje de glicerol en la hidratación del aceite y las gotitas, respectivamente. En la muestra de referencia, si el glicerol no está presente ni en la hidratación del aceite ni en las gotitas, las gotitas se encogen en promedio. Si las gotitas contienen glicerol mientras que la hidratación del aceite no lo hace, las gotitas crecen con respecto a la referencia porque la adición de glicerol a las gotitas hace que la actividad del agua en el

aceite sea mayor que la actividad del agua en las gotitas. Lo contrario sucede cuando se agrega glicerol a la hidratación del aceite pero no a las gotitas. Las gotitas se encogen en relación con la referencia debido a una mayor actividad de agua en las gotitas en comparación con el aceite. Esto muestra que el contenido específico de las gotitas y la hidratación del aceite se pueden usar para controlar la contracción y el crecimiento de las gotitas.

% de glicerol en hidratación de aceite	% de glicerol en gotitas	Cambio de volumen de gotitas
0	0	-30% (contrae)
0	4	+44% (crece)
4	0	-51% (contrae)

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar el tamaño de microgotitas y/o mantener u optimizar las reacciones enzimáticas o químicas que ocurren en las mismas, teniendo dichas microgotitas un volumen promedio en el rango de 0.5 femtolitros a 10 nanolitros compuesto por al menos un componente biológico y un primer medio acuoso que tiene una actividad de agua de a_{w1} de menos que 1 caracterizada por el paso de mantener las microgotitas en un fluido portador inmiscible en agua que incluye además gotitas secundarias compuestas por un segundo medio acuoso que tiene un volumen promedio menor al 25% del volumen promedio de la microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen del fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1 para manipular el tamaño y/o la reactividad química o enzimática del contenido de microgotitas que tienen un volumen promedio en el rango de 0.5 femtolitros a 10 nanolitros; las microgotitas están compuestas por al menos un componente biológico y un primer medio acuoso libre de células biológicas que tienen una actividad de agua de a_{w1} menor que 1 caracterizado por el paso de mantener las microgotitas en un fluido portador inmiscible en agua que además incluye gotitas secundarias compuestas de un segundo medio acuoso y que tiene un volumen promedio menor que 25% del volumen promedio de las microgotitas hasta un máximo de 0.5 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen del fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2:1.
3. Un método como se reivindica en la reivindicación 1 para controlar la reactividad química o enzimática y/o el tamaño de microgotitas en microgotitas que tienen un volumen promedio en el rango de 4 femtolitros a 10 nanolitros; las microgotitas están compuestas por al menos una célula biológica y un primer medio acuoso que tiene una actividad acuosa de a_{w1} de menos que 1, caracterizado por el paso de mantener las microgotitas en un fluido portador inmiscible en agua que además incluye gotitas secundarias compuestas de un segundo medio acuoso y con un volumen promedio inferior al 25% del volumen promedio de las microgotitas hasta un máximo de 4 femtolitros inclusive y en donde la relación de volumen del fluido portador al volumen total de microgotitas por unidad de volumen del total es mayor que 2: 1.
4. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las gotitas secundarias tienen una actividad de agua a_{w2} que es mayor que a_{w1} .
5. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las gotitas secundarias tienen una actividad de agua a_{w2} que es menor que a_{w1} .
6. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las actividades del agua a_{w1} y a_{w2} son las mismas.
7. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque a_{w1} y a_{w2} están independientemente en el rango de 0.9 a 1.
8. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, caracterizado porque la fuerza iónica del segundo medio acuoso está en el rango de 1 a 5 veces que del primer medio acuoso.
9. Un método como se reivindica en la reivindicación 5, caracterizado porque la fuerza iónica del primer medio está en el rango de 1 a 5 veces que del segundo medio acuoso.
10. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el volumen promedio de las gotitas secundarias es menos del 10% del volumen promedio de las microgotitas.
11. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al menos uno de los medios acuosos primero y segundo comprende además glicerol.
12. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el componente biológico se selecciona de un trifosfato de nucleósido único derivado de un ácido nucleico objetivo, un oligonucleótido derivado del ADN o ARN de una célula, una enzima o una célula.
13. Un método como se reivindica en la reivindicación 12, caracterizado porque el primer y/o segundo medio acuoso son reguladores.
14. Un método como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el método comprende además provocar la proliferación celular de uno o más tipos de células contenidos dentro de una microgotita que tiene un volumen promedio en el rango de 4 femtolitros a 10 nanolitros incubando las células dentro del gotitas en condiciones ambientales adecuadas y posteriormente detectando el número de células dentro de cada gotita.
15. Un método como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el método comprende además analizar o detectar uno o más rasgos fenotípicos, rasgos genéticos o perfiles de expresión de proteínas de una célula bajo consideración, estando contenida esa célula dentro de una microgotita que tiene un volumen promedio en el rango 4 femtolitros a 10 nanolitros y compuesto por un regulador acuoso, marcando un objetivo derivado de las células.

- 5 16. Un método como se reivindica en la reivindicación 2, en donde el método comprende además secuenciar digiriendo progresivamente por pirofosforólisis un analito de ácido nucleico en una corriente ordenada de moléculas de nucleósido trifosfato y generar a partir de ella una corriente ordenada correspondiente de microgotitas que tienen un volumen promedio en el rango de 0.5 femtolitros a 10 nanolitros y cada uno compuesto por una de las moléculas de nucleósido trifosfato y regulador acuoso; hacer reaccionar cada molécula de nucleósido trifosfato dentro de cada microgotita con una sonda fluorescente específica de la nucleobase y, a continuación, detectar la fluorescencia correspondiente asociada con cada microgotita identificando así la nucleobase.
- 10 17. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado porque la relación de las actividades de agua de las microgotitas y las gotitas secundarias está en el rango de 0.9:1 a 1:0.9; preferiblemente de 0.95:1 a 1:0.95.

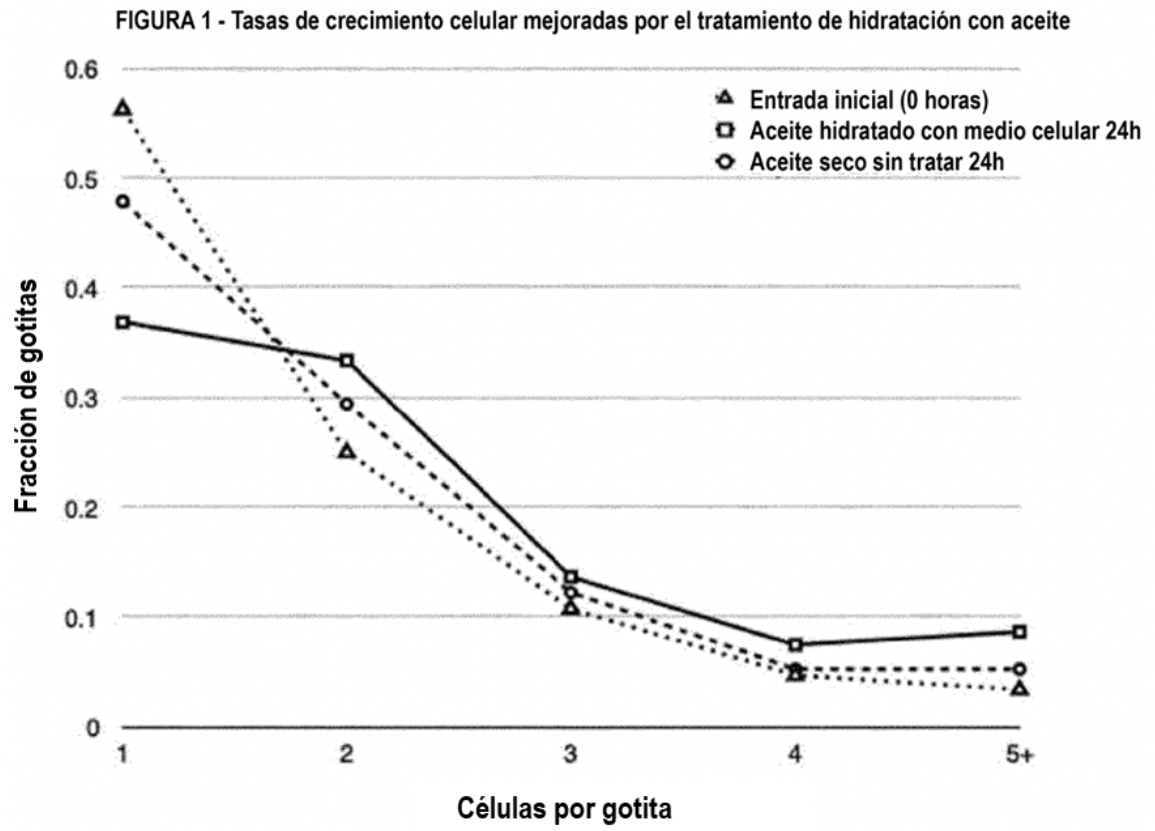


FIGURA 2 - Intensidad de fluorescencia

