

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 108**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14718148 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2828409**

54 Título: **Método de detección de nucleótidos simples**

30 Prioridad:

09.04.2013 GB 201306445

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

10.02.2016

73 Titular/es:

**BASE4 INNOVATION LTD (50.0%)
Broers Building, J J Thomson Avenue
Cambridge, Cambridgeshire CB3 0FA, GB y
MEDICAL RESEARCH COUNCIL (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 559 108 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 detección de nucleótidos simples.

5 Esta invención se refiere a un método para caracterización de RNA o DNA por detección de una secuencia ordenada de bases nucleotídicas simples generadas a partir de ellos por degradación progresiva.

La secuenciación de generaciones próximas de material genético está produciendo ya un impacto significativo en las ciencias biológicas en general y la medicina en particular, dado que el coste unitario de la secuenciación disminuye linealmente con la aparición en el mercado de máquinas de secuenciación cada vez más rápidas. Así, en una máquina de este tipo, un analito de DNA bicatenario se descompone primeramente en una pluralidad de fragmentos polinucleotídicos más pequeños, cada uno de los cuales se somete primeramente a adenilación en ambos extremos de una cadena de tal modo que puede fijarse un primer oligonucleótido monocatenario a ambos extremos de su complemento por hibridación a la base adenina no apareada. Los fragmentos tratados así obtenidos se seleccionan luego por tamaños y se capturan sobre una superficie recubierta con segundos oligonucleótidos monocatenarios fijados que son por sí mismos el complemento secuencial del primero de tal modo que puede crearse de hecho una biblioteca de fragmentos bicatenarios fijados a la superficie por hibridación ulterior. En un paso de agrupación subsiguiente, estos componentes de biblioteca se amplifican luego por clonación millones de veces en la superficie utilizando reacciones de extensión y formación isotérmica de puentes para utilizar segundos oligonucleótidos no usados. Esto, de hecho, crea una concentración densa del fragmento polinucleotídico fijado a la superficie por una de sus cadenas. La cadena complementaria no fijada de cada fragmento se retira luego para dejar fragmentos monocatenarios fijados listos para secuenciación. En la etapa de secuenciación, cada uno de estos fragmentos monocatenarios se ceba y se crea de nuevo su cadena complementaria por extensión utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y una mezcla de las cuatro bases nucleotídicas características del DNA en forma de didesoxinucleótido-trifosfato (ddNTP). Cada tipo de ddNTP está bloqueado terminalmente con un resto que está marcado con un fluoróforo diferente que emite fluorescencia a una longitud de onda distinta. La reacción de extensión toma luego la forma de un ciclo de tres pasos; en primer lugar, el ddNTP relevante se incorpora a la cadena en crecimiento; en segundo lugar, la base nucleotídica que contiene el mismo se identifica por iluminación de la muestra y detección de la longitud de onda de la fluorescencia, y finalmente el bloque terminal y su fluoróforo asociado se retiran para permitir que tenga lugar el evento de extensión siguiente. Por este medio, la secuencia de la cadena complementaria puede construirse base a base. Se apreciará que, si bien este enfoque puede ser en gran parte automatizado y puede generar lecturas de secuencia de alta exactitud, su velocidad de operación está limitada por la velocidad del ciclo de extensión. Así, en la práctica, el uso de la tecnología tiende a implicar procesamiento paralelo de fragmentos polinucleotídicos relativamente cortos y ensamblaje de la secuencia total a partir de las diversas lecturas obtenidas de este modo. Esto puede conducir en sí mismo a complejidades de computación y a la posible introducción de errores.

Más recientemente, se han hecho esfuerzos en el desarrollo de métodos de secuenciación directa. Por ejemplo, WO 2009/030953 da a conocer un nuevo secuenciador rápido en el cual, *inter alia*, la secuencia de bases o pares de bases nucleotídicas en una muestra de polinucleótido mono- o bicatenaria (v.g. RNA o DNA existente naturalmente) se lee por translocación de la misma a través de un sustrato nano-perforado provisto de nanoestructuras plasmónicas yuxtapuestas en o adyacentes a la salida de los nanoporos. En este dispositivo, las nanoestructuras plasmónicas definen ventanas de detección (esencialmente un campo electromagnético) dentro de las cuales cada base nucleotídica (opcionalmente marcada) se ve inducida sucesivamente a emitir fluorescencia o dispersar fotones Raman de manera característica por interacción con la luz incidente. Los fotones así generados se detectan luego a distancia, se multiplexan y se convierten en una corriente de datos cuyo contenido de información es característico de la secuencia de bases nucleotídicas asociada con el polinucleótido. Esta secuencia puede recuperarse luego de la corriente de datos generando algoritmos de computación materializados en software correspondiente programado en un microprocesador integral con el mismo o en un dispositivo de computación auxiliar unido al mismo. Antecedentes adicionales acerca del uso de nanoestructuras plasmónicas y sus características de resonancia asociadas pueden encontrarse, por ejemplo, en Adv. Mat. 2004, 16(19), pp. 1685-1706.

Otro aparato para secuenciación rápida de polinucleótidos se describe, por ejemplo, en US 6.627.067, US 6.267.872 y US 6.746.594. En su forma más simple, este dispositivo emplea electrodos, en lugar de nanoestructuras plasmónicas, para definir la ventana de detección a través del sustrato o en o alrededor de la salida del nanoporo. Se aplica luego una diferencia de potencial a través de los electrodos y en función del tiempo los cambios en las características eléctricas del medio iónico que fluye entre ellos, como consecuencia de la translocación electroforética del polinucleótido y el electrólito asociado a través del nanoporo, se miden. En este dispositivo, a medida que las diversas bases nucleotídicas individuales pasan a través de la ventana de detección, las mismas bloquean y desbloquean continuamente ésta, causando 'eventos' que dan lugar a fluctuaciones características en flujo de corriente o resistividad. Estas fluctuaciones se utilizan luego para generar una corriente de datos adecuada para el análisis como se describe arriba.

La generación de corrientes estables de gotitas, especialmente corrientes de microgotitas, es otra área de desarrollo de tecnología que tiene ya aplicaciones en biología molecular. Por ejemplo, US 7.708.949 da a conocer un nuevo

método de naturaleza microfluida para generar gotitas estables de agua en aceite mientras que, por ejemplo, US 2011/0250597 describe la utilización de esta tecnología para generar microgotitas que contienen un molde de ácido nucleico (típicamente un fragmento polinucleotídico de DNA o RNA) y una pluralidad de pares de cebadores que hacen posible la amplificación del molde utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Otras solicitudes de patente relativas a este campo incluyen en general JP2004/290977, JP2004/351417, US2012/0122714, US2011/0000560, US2010/01376163, US2010/0022414 y US2008/0003142.

WO 2004/002627 da a conocer un método para creación de dispersiones líquido-líquido y gas-líquido utilizando diversos dispositivos que comprenden la creación de una sección discontinua entre regiones microfluidas situadas aguas arriba y aguas abajo. Sin embargo, no se expone su aplicación a la secuenciación de nucleótidos simples de DNA.

WO 2010/077859 expone un accionador de gotitas que comprende un sustrato provisto de electrodos, un camino de reactor y depósitos de base nucleotídica, tampón de lavado, muestra y enzima. Si bien se dice genéricamente que el accionador es útil para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, no se expone doctrina alguna acerca del método de degradación del analito descrito más adelante por los presentes inventores. En lugar de ello, el documento se refiere a un enfoque completamente diferente; la observación de la síntesis de una cadena complementaria del analito utilizando pirosecuenciación. US 2009/0280475 se refiere a una materia objeto similar.

Se ha descubierto ahora un nuevo método de secuenciación que, en una realización, implica la generación de una corriente de bases nucleotídicas cuya ordenación es característica de la secuencia del analito por degradación progresiva de éste; y una captura subsiguiente de cada base nucleotídica de una manera que hace posible la detección de la misma.

WO 94/18218 da a conocer un secuenciador genómico en el cual una corriente ordenada de nucleótidos simples se separa de un analito y después de ello queda contenida en una matriz sólida intensificadora de la fluorescencia en la que cada nucleótido se excita utilizando un láser y se detecta su emisión espectroscópica característica. El método de transferencia de nucleótidos simples utilizado por este secuenciador implica la creación de una sola envoltura doble de líquidos inmiscibles fluyentes en lugar de una serie de gotitas. Adicionalmente, el secuenciador descrito pretende detectar los nucleótidos simples directamente en lugar de emplear un sistema de captura y método de liberación de fluoróforos del tipo descrito en esta memoria. Los autores de la presente invención creen que esto es un inconveniente dado que conducirá a problemas de ratio señal a ruido cuando vayan a ser detectadas las emisiones. Esto pondrá en compromiso la sensibilidad global y por tanto la aplicabilidad práctica del propio secuenciador.

Stephan et al., Journal of Biotechnology 86 (2001) pp. 255-267, exponen un método general para recuento de nucleótidos simples generados por degradación exonucleolítica de una muestra de DNA inmovilizada marcada con fluoróforos. Sin embargo, no se proporciona información alguna acerca de la diferenciación entre los diferentes tipos de nucleótidos simples generados. US2003/0138831 da a conocer un método de secuenciación, en el cual se separan del polinucleótido monómeros terminales por actividad de exonucleasas y se detectan con un aptámero.

El uso de la degradación pirofosforolítica progresiva de polinucleótidos para generar una corriente de bases nucleotídicas simples en forma de desoxirribonucleotido-trifosfatos ha sido dado a conocer en forma esquemática en <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/happy/HappyGroup/seg.html>, aunque se proporciona poca información acerca de la metodología real empleada. Adicionalmente, WO 03/080861 describe un método de secuenciación en el cual un analito de DNA se degrada secuencialmente en una corriente ordenada de nucleótidos simples por medio de pirofosforólisis realizada en presencia de un anión pirofosfato marcado con un tinte inteligente. En un ejemplo, el anión pirofosfato está marcado con el tinte JF-4 que tiene tiempos de vida de fluorescencia diferentes dependiendo del tipo de nucleótido particular al que se fija. La corriente de nucleótidos simples marcados es excitada luego por un láser y analizada espectroscópicamente para determinar la naturaleza y por consiguiente la ordenación de los nucleótidos. Una vez más los nucleótidos simples se detectan directamente en vez de por el empleo del método y sistema de captura y de liberación de fluoróforos descrito más adelante. Por tanto, se cree que este método conducirá también a problemas de ratio señal a ruido y por consiguiente de sensibilidad.

WO 2006/115.570 da a conocer sondas para la detección de moléculas pequeñas de ácido nucleico.

Conforme a la presente invención, se proporciona un método para determinación de la secuencia de bases nucleotídicas en un analito polinucleotídico como se define en las reivindicaciones 1-21 adjuntas. El método se caracteriza por los pasos de (1) generación de una corriente de bases nucleotídicas simples a partir del analito; (2) producir moléculas capturadas por reacción de cada base nucleotídica simple con un sistema de captura; (3) amplificar al menos parte de la molécula capturada para producir una pluralidad de amplicones característicos de la base nucleotídica simple; (4) marcar los amplicones una sonda correspondiente que tiene un elemento detectable característico y (5) detectar una propiedad característica del elemento detectable.

El paso (1) del método de la presente invención comprende generar una corriente de bases nucleotídicas simples a partir de un analito polinucleotídico. El analito empleado en este paso es convenientemente un polinucleótido bicate-

nario constituido por muchas bases nucleotídicas. En principio, la longitud del polinucleótido puede ser ilimitada, con inclusión de hasta los muchos millones de bases nucleotídicas encontrados en un fragmento del genoma humano. El analito propiamente dicho es convenientemente RNA o DNA de origen natural, aunque el método puede utilizarse también para secuenciar DNA o RNA producidos por síntesis u otro ácido nucleico constituido totalmente o en parte por bases nucleotídicas que no se encuentran comúnmente en la naturaleza; es decir, bases nucleotídicas distintas de adenina, timina, guanina, citosina y uracilo. Ejemplos de éstas incluyen 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, dihidrouridina, 2-O-metilpseudouridina, 2-O-metilguanosina, inosina, N6-isopentiladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metoxiuridina, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 2-metilto-N6-isopenteniladenosina, éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético, ácido uridina-5-oxiacético, wybutosina, wybutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, 2-O-metil-5-metiluridina and 2-O-metiluridina.

El paso (1) comprende adicionalmente un primer sub-paso de fijación del analito polinucleotídico a un sustrato. Típicamente, el sustrato comprende una superficie de naturaleza microfluida, una micro-perla o una membrana permeable constituida por vidrio o un polímero no degradable. Preferiblemente, el sustrato comprende además una superficie adaptada para recibir el analito. Existen muchas maneras en las cuales el analito puede fijarse a tales superficies, todas las cuales pueden utilizarse en principio. Por ejemplo, un método implica el cebado de una superficie de vidrio con un silano funcionalizado tal como un epoxisilano, un aminohidrocarbilsilano o un mercaptosilano. Los sitios reactivos así generados pueden tratarse luego con un derivado del analito que tiene un grupo terminal amina, succinilo o tiol.

En una realización del paso (1), el analito se trata para generar una corriente de bases nucleotídicas simples cuya ordenación corresponde a la secuencia del primero. Este paso se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida en el intervalo de 20 a 90°C en presencia de un medio de reacción que comprende una enzima. Preferiblemente, este tratamiento se lleva a cabo en condiciones de flujo distintas del equilibrio de tal modo que las bases nucleotídicas simples se retiren continuamente de la zona de reacción. Muy preferiblemente, la reacción se lleva a cabo haciendo que un medio acuoso tamponado que contiene la enzima fluya continuamente sobre la superficie a la que está fijado el analito.

La enzima utilizada en el paso (1) es una que puede causar degradación 3'-5'-pirofosforolítica progresiva del analito para producir desoxirribonucleótido-trifosfatos a una velocidad de reacción razonable. Preferiblemente, esta velocidad de degradación es lo más rápida posible, y en una realización está comprendida en el intervalo de 1 a 50, preferiblemente 1 a 20 bases nucleotídicas por segundo. Información adicional acerca de la reacción de pirofosforólisis tal como se aplica a polinucleótidos puede encontrarse por ejemplo en J. Biol. Chem. 244 (1969) pp. 3019-3028. La enzima que se emplea en esta reacción de pirofosforólisis se selecciona adecuadamente del grupo constituido por aquellas polimerasas que no exhiben esencialmente actividad alguna de exo- ni endonucleasa en las condiciones de reacción. Ejemplos de polimerasas que pueden utilizarse ventajosamente incluyen, pero sin carácter limitante, las enzimas procariotas pol1 o derivados de enzimas obtenidos de bacterias tales como *Escherichia coli* (v.g., polimerasa del fragmento Klenow), *Thermus aquaticus* (v.g. Taq Pol) y *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldovelox* y *Bacillus caldotenax*. Convenientemente, la degradación pirofosforolítica se lleva a cabo en presencia de un medio que comprende adicionalmente anión pirofosfato y cationes magnesio, en concentraciones preferiblemente milimolares. En un aspecto de la presente descripción, pueden generarse desoxirribonucleótido-trifosfatos en dos pasos por tratamiento del analito con una exonucleasa y una quinasa.

En el paso (2) del método de la presente invención, cada base nucleotídica simple generada en el paso (1) es capturada por el sistema de captura propiamente dicho que comprende un oligómero de bases nucleotídicas. Preferiblemente, antes de llevar a cabo este paso, el medio acuoso que contiene las bases nucleotídicas simples se trata con una pirofosfatasa para hidrolizar cualquier pirofosfato residual a anión fosfato.

En una primera realización, el sistema de captura comprende uno de una clase de pares de oligonucleótidos primero y segundo. El primer oligonucleótido en un par de este tipo comprende preferiblemente (a) una primera región bicatenaria y (b) una segunda región monocatenaria constituida por n bases nucleotídicas en las cuales n es mayor que 1, preferiblemente mayor que 5. En una sub-clase, puede considerarse que el primer oligonucleótido tiene una estructura molecular derivada de un precursor oligonucleotídico monocatenario hipotético o real en el que la región bicatenaria se ha creado por plegado parcial del extremo 3' del precursor sobre sí mismo para generar una configuración que puede denominarse 'en forma de j'. En otra subclase, el primer oligonucleótido se genera por hibridación de un tercer oligonucleótido monocatenario más corto en el extremo 3' de un cuarto oligonucleótido monocatenario más largo y haciendo luego que el extremo de la molécula resultante que es bicatenaria 'se haga romo' por medio de un grupo protector que puentea por ejemplo los oligonucleótidos finales de las dos cadenas. Típicamente, la longitud total del primer oligonucleótido es hasta 150 bases nucleotídicas, preferiblemente entre 20 y 100 bases nucleotídicas. Al mismo tiempo, se prefiere que el número entero n esté comprendido entre 5 y 40, preferiblemente entre 10 y 30.

En lo que respecta al segundo oligonucleótido del par, éste es monocatenario y tiene convenientemente una secuencia de bases nucleotídicas que es total o parcialmente el complemento correspondiente a la región monocatenaria del primer oligonucleótido una base nucleotídica más allá del extremo de la región bicatenaria. La longitud del segundo oligonucleótido no es crítica y puede ser más larga o más corta que la región monocatenaria a la que puede estar fijado el mismo, aunque preferiblemente no tiene una longitud de $n-1$ bases nucleotídicas. Más preferiblemente, la longitud del segundo oligonucleótido se selecciona de tal manera que en la molécula capturada queda un saliente corto de bases nucleotídicas no apareadas (v.g. 2 a 10 bases nucleotídicas) en una u otra de las dos cadenas del mismo. Los sistemas de captura de esta clase operan por fijación de la base nucleotídica simple al extremo bicatenario del primer oligonucleótido e hibridación y ligación del segundo oligonucleótido a la región monocatenaria restante para generar una molécula capturada que es bicatenaria aparte de su saliente.

En una segunda realización, el sistema de captura comprende una clase de oligonucleótidos simples cada uno de los cuales está constituido por una región de nucleótidos monocatenaria cuyos extremos están unidos a dos regiones bicatenarias diferentes. En los sistemas de captura de esta clase, la región nucleotídica monocatenaria está constituida por una sola base nucleotídica, lo que hace que la sonda sea sólo extremadamente selectiva para la detección de la diana, es decir la base nucleotídica simple complementaria en la corriente.

Volviendo a la o las regiones oligonucleotídicas bicatenarias, se prefiere que las mismas se deriven o puedan pagarse más para TSO2 a derivarse de dos precursores oligonucleotídicos, cada uno preferiblemente en forma de bucle cerrado, o de un precursor oligonucleotídico monocatenario común por replegado de los extremos del último de nuevo sobre sí mismos para crear dos regiones de base oligonucleotídicas en forma de bucle cerrado con un espacio intermedio constitutivo de la región nucleotídica monocatenaria. En todos los casos, el efecto es el mismo; adyacentemente a los extremos de la región nucleotídica monocatenaria habrá extremos 3' y 5' libres en la otra cadena de la región oligonucleotídica a la cual pueden fijarse los extremos 5' y 3' correspondientes de la diana. Así, el uso del sistema de captura implica un proceso de unión de la región nucleotídica monocatenaria a la base nucleotídica simple diana por unión de la misma con los extremos 3' y 5' disponibles del sistema de captura para generar una molécula capturada que es bicatenaria en toda su longitud.

Convenientemente, la o las regiones oligonucleotídicas bicatenarias tienen una longitud de hasta 50 pares de bases nucleotídicas, preferiblemente hasta 45 pares de bases nucleotídicas, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 40 pares de bases nucleotídicas y muy preferiblemente en el intervalo de 10 a 30. Pueden utilizarse regiones más largas, pero el riesgo potencial del acceso a la región nucleotídica monocatenaria por la diana puede llegar a verse restringido por enmarañamiento. Ello hace que esta realización sea potencialmente menos atractiva.

Para ambas clases arriba mencionadas, se prefiere emplear simultáneamente en el paso (2) una mixtura de al menos dos series diferentes de moléculas de captura, cada una de ellas selectiva de una base nucleotídica complementaria diferente y cada una de las cuales tiene una región nucleotídica característica al cual puede unirse por hibridación una sonda característica diferente. Al menos esta región nucleotídica característica se amplifica luego en el paso (3) para producir amplicones múltiples a los cuales puede fijarse la sonda en el paso (4). Cuando el analito es DNA o RNA, es muy preferible emplear al mismo tiempo cuatro sistemas de captura diferentes, cada uno de los cuales será selectivo para una base nucleotídica diferente y una sonda diferente.

El paso (2) se efectúa convenientemente poniendo en contacto cada base nucleotídica simple en la corriente con el sistema de captura, muy preferiblemente el sistema de captura de cuatro componentes arriba mencionado, en condiciones en las que se hace que la base nucleotídica simple sea capturada para generar la molécula capturada que es totalmente bicatenaria o bicatenaria excepto por cierto grado de saliente de cadena arriba mencionado. Esta captura se efectúa convenientemente poniendo en contacto el nucleótido simple y el sistema de captura juntos a una temperatura en el intervalo de 30 a 80°C en presencia de un sistema enzimático de dos componentes que comprende una segunda polimerasa y una ligasa. En una realización preferida, la segunda polimerasa es la misma que la utilizada en el paso (1), evitándose con ello la necesidad de añadir ésta en la forma de un componente suplementario.

En el paso (3) del método de la presente invención, la molécula capturada se amplifica utilizando cualquiera de los métodos disponibles en la técnica que son compatibles con la mixtura de productos generada en el paso (2). Estos métodos incluyen, pero sin carácter limitante, métodos de ciclación térmica e isotérmicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación de la polimerasa recombinasa y amplificación en circuito rodante; siendo la última de éstas especialmente útil para moléculas capturadas derivadas de la segunda clase de molécula de captura arriba descrita. Por cualquiera de estos medios, pueden generarse rápidamente muchas copias de una parte de la molécula capturada y su complemento de secuencia (al que se hace referencia típicamente en la técnica como un amplicón). Las metodologías exactas para la realización de cualquiera de estos métodos de amplificación son bien conocidas por una persona con experiencia ordinaria en la técnica y están disponibles fácilmente en la bibliografía. Por ejemplo, en el caso de la reacción en cadena de la polimerasa, la metodología comprende generalmente (a) desnaturalización de la molécula capturada a temperatura elevada de tal modo que la misma esté de hecho descomprimida a un estado monocatenario correspondiente, (b) reasociación de un oligonucleótido cebador monocatenario corto con la molécula de captura descomprimida en o cerca de su extremo 3', (c) extensión del cebador en la dirección 5'-3' hasta que se crea la cadena complementaria de la molécula de captura descomprimida;

(d) desnaturalización del producto del paso (c) para regenerar la molécula de captura descomprimida y la cadena complementaria, ambas en forma monocatenaria, y (e) repetición de los pasos (b) a (d) múltiples veces para realizar copias múltiples de los amplicones de manera exponencial. Así, el paso (3) comprende en la práctica el tratamiento del producto del paso (2) con al menos un cebador, una polimerasa y, en el caso de DNA, por ejemplo, una mixtura de los cuatro desoxirribonucleótido-trifosfatos característicos del mismo. Dado que el paso (3) implica la introducción de la totalidad de los cuatro desoxirribonucleótido-trifosfatos, es importante que la captura de estos desoxirribonucleótido-trifosfatos añadidos por el sistema de captura se evite a fin de impedir la generación de moléculas capturadas adicionales características de las otras bases nucleotídicas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por desactivación de la ligasa empleada en el paso (2) v.g. por tratamiento térmico, antes de la adición de los desoxirribonucleótido-trifosfatos. Por lo demás, las condiciones de reacción y reactivos utilizados para realización de la reacción en cadena de la polimerasa en el paso (3) son convenientemente los descritos en la técnica. En el caso del sistema de cuatro componentes arriba expuesto, el paso (3) implicará la adición de hasta cuatro pares de cebadores diferentes, siendo cada par selectivo para uno o más de los cuatro segundos oligonucleótidos en el sistema de captura. En una realización preferida, se utiliza un único par de cebadores que es selectivo de los cuatro segundos oligonucleótidos en el sistema de captura.

En el paso (4) del método de la presente invención, los amplicones se marcan con una sonda que tiene un elemento detectable característico. Este paso puede llevarse a cabo una vez que se ha completado el ciclo final de la amplificación en el paso (3), o más preferiblemente al mismo tiempo que está realizándose el paso (3). Preferiblemente, la sonda es una en la cual el elemento detectable no es detectable hasta que la sonda se ha fijado al amplicón, y convenientemente la propiedad detectable exhibida por el elemento detectable es fluorescencia. Preferiblemente, la sonda es un oligonucleótido que es capaz de fijarse a una secuencia exclusiva en su amplicón correspondiente por hibridación. En una realización, la sonda empleada es un ejemplo de las conocidas en la técnica como balizas moleculares. Las balizas moleculares están constituidas típicamente por oligonucleótidos monocatenarios que se han plegado de hecho sobre sí mismos para crear un bucle monocatenario residual, que actúa como el sensor de la baliza, y un vástago corto en el cual las bases nucleotídicas adyacentes a los dos extremos están unidas una a otra por apareamiento de bases nucleotídicas complementarias; creándose con ello una región bicatenaria. Esta disposición, que puede asemejarse a una horquilla en la cual el bucle monocatenario está unido a cadenas complementarias del mismo extremo de un oligonucleótido bicatenario hipotético, está fuertemente tensionada. A los extremos libres 3' y 5' del oligonucleótido (adyacentes ahora uno a otro y al extremo alejado del vástago) están unidos respectivamente un fluoróforo y un atenuador. Su proximidad geométrica uno a otro asegura entonces que, en su estado no utilizado, no se produce fluorescencia significativa alguna. Como se utiliza en esta memoria, la baliza molecular se elige de tal manera que su bucle puede hibridarse selectivamente a la secuencia exclusiva del amplicón causando por tanto una tensión adicional que descomprime el vástago de la baliza, causa el distanciamiento del fluoróforo y el atenuador, y permite que la baliza emita fluorescencia. Una vez más, cuando se emplea el sistema de cuatro componentes arriba descrito, se utiliza una mixtura de cuatro balizas moleculares, selectiva cada una de ellas de uno de los amplicones. Sondas alternativas que pueden emplearse incluyen, por ejemplo, sondas Taqman, sondas escorpión y moléculas capaces de comportarse de manera similar.

Finalmente, en el paso (5) se detectan los elementos detectables activados por fijación a los amplicones, permitiendo que la base nucleotídica simple particular sea identificada y se recupere la secuencia de bases nucleotídicas en el análisis de la corriente de datos asociada con la detección. Métodos para hacer esto son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, la fluorescencia de la baliza molecular activada puede detectarse utilizando un fotodetector o un dispositivo equivalente sintonizado a la o las longitudes de onda de fluorescencia características o la o las envolventes de longitud de onda de sus fluoróforos. Esto hace a su vez que el fotodetector genere una señal eléctrica característica del tipo de base nucleotídica particular que puede procesarse y analizarse después de ello, por ejemplo por una computadora.

En una realización particularmente preferida, el método de la presente invención se lleva a cabo totalmente o en parte en microgotitas. Un método de este tipo puede comenzar, por ejemplo, por inserción de las bases nucleotídicas simples generadas en el paso (1), una a una, en una corriente correspondiente de microgotitas acuosas en un disolvente portador inmiscible tal como un hidrocarburo o aceite de silicona para ayudar a preservar la ordenación. Ventajosamente, esto puede efectuarse por creación directa de la corriente de microgotitas aguas abajo de la zona de reacción de pirofosforólisis, por ejemplo haciendo que el medio de reacción emerja de un cabezal de microgotitas de dimensiones adecuadas en una corriente fluyente del disolvente. Alternativamente, pequeñas partes alícuotas del medio de reacción pueden inyectarse secuencialmente en una corriente de microgotitas acuosas pre-existentes suspendidas en el disolvente. Si se adopta este último enfoque, cada microgotita puede contener convenientemente los componentes del sistema de captura y las diversas enzimas y cualesquiera otros reactivos (p.ej. tampón) requerido(s) para realizar el paso (2). Por último, las microgotitas creadas en la primera realización pueden verse obligadas a fusionarse subsiguientemente con una corriente de tales microgotitas preexistentes para alcanzar un resultado similar. En esta realización el paso (5) implica entonces preferiblemente investigar cada gotita para identificar los elementos detectables que han sido activados por los amplicones y por consiguiente la naturaleza de la base nucleotídica que contiene la misma.

A fin de evitar el riesgo de que una microgotita dada contenga más de una sola base nucleotídica, se prefiere liberar las bases nucleotídicas simples en el paso (1) a una velocidad tal que cada microgotita llena esté separada por 1 a

20, preferiblemente 2 a 10 microgotitas vacías. Después de ello, la corriente de microgotitas llenas y vacías con el disolvente se hace fluir a lo largo de un camino de flujo, convenientemente un camino de flujo microfluído, a una velocidad y de una manera tal que las microgotitas se mantienen en un estado discreto y no tienen oportunidad de aglutinarse unas con otras. Convenientemente, las microgotitas empleadas tienen un diámetro menor que 100 micrómetros, preferiblemente menor que 50 micrómetros, más preferiblemente menor que 20 micrómetros y aún más preferiblemente menor que 15 micrómetros. Muy preferiblemente, la totalidad de sus diámetros estarán comprendidos en el intervalo de 2 a 20 micrómetros. En una realización, la velocidad de flujo de las microgotitas a lo largo de todo el sistema está comprendida en el intervalo de 50 a 3000 gotitas por segundo, preferiblemente 100 a 2000.

La presente invención se ilustrará a continuación con referencia a los ejemplos que siguen.

Preparación y uso de un sistema de captura

El experimento siguiente ilustra la captura de una sola base nucleotídica y la liberación de fluoróforos utilizando un sistema de captura en el que el primer oligonucleótido tiene forma de j y el segundo es monocatenario.

Una muestra de un oligonucleótido en forma de j como se ha descrito arriba se prepara por plegado de un oligonucleótido monocatenario de 75 bases nucleotídicas, que tiene la secuencia siguiente: gtaggctctggcacagaaaaaggagGcagtgatgttccatgactgatttttttcagtcaggaacatcact*g donde g, t, c y a representan la notación convencional para las bases nucleotídicas del DNA y * representa la presencia de un enlace fosforotioato. El plegado se lleva a cabo por calentamiento de una solución acuosa de este oligonucleótido a 95°C seguido por enfriamiento lento del mismo a la temperatura ambiente a una velocidad de 10 minutos por °C. La molécula en forma de j así obtenida comprende una región de oligonucleótido monocatenario residual (gtaggctctggcacagaaaaaggag) unida a una base nucleotídica simple que es el sitio de captura (con letra mayúscula en la secuencia arriba mencionada).

Se prepara también un oligonucleótido monocatenario correspondiente, que tiene la secuencia siguiente:

[^]ctccTTXTTtctgtgccaga en donde [^] representa un grupo 5' fosfato, una T mayúscula representa una base timina marcada con tinte Alexa Fluor 488 por un enlazador azida, y una X representa una base timina marcada con un atenuador BHQ-1.

Se preparan luego mezclas de captura y bases nucleotídicas separadas. La mezcla de captura tiene una composición correspondiente a la derivada de la formulación siguiente:

2,5 µl 10 x Tampón II
 5 µl 10 x tampón Taq Ligasa (NEB)
 2,5 µl 100 nM de las moléculas en forma de j arriba mencionada
 5 µl de 100 nM del oligonucleótido monocatenario arriba mencionado
 2 µl Pirofosfatasa Inorgánica Termoestable (NEB)
 5 µl ligasa Taq (NEB)
 1 µl MnSO₄ 25 mM
 agua hasta 25 µl

mientras que la mezcla de bases nucleotídicas, cuya composición está diseñada para mimetizar el material, obtenido del paso de pirofosforólisis, corresponde a la derivada de la formulación: 2,5 µl 10 x Tampón II (suministrado con Amplitaq; exenta de magnesio)

1,5 µl MgCl₂ 25 mM
 2,5 µl 10 nM de desoxicitidina-trifosfato (dCTP)
 2 µl Amplitaq (5 U/µl)
 2,5 µl 10 mM pirofosfato de sodio
 agua hasta 25 µl.

La captura del dCTP se efectúa luego mezclando uno con otro volúmenes iguales de estas dos mezclas e incubando el producto resultante a 50 °C. Esto se completa típicamente en 30 minutos.

Método microfluído de gotitas que utiliza el sistema de captura en

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un dispositivo de secuenciación microfluído en el cual microgotitas, cada una de las cuales contiene una base mononucleotídica, se someten a reacción con un sistema de captura del tipo anterior arriba descrito.

Un medio acuoso 1 que comprende una corriente de mononucleótidos obtenidos por la pirofosforólisis progresiva de un analito polinucleotídico de 100 bases nucleotídicas derivado de DNA humano se hace fluir a través de un tubo microfluído de 10 micrómetros de diámetro fabricado a partir de polímero PDMS. La reacción de pirofosforólisis propiamente dicha se lleva a cabo haciendo pasar una corriente de un medio de reacción acuoso tamponado (pH 8)

a 72°C, que comprende *Taq Pol* y una concentración de 2 milimoles por litro de cada uno de pirofosfato de sodio y cloruro de magnesio, sobre una microperla de vidrio a la cual se ha fijado previamente el analito por medio de un puente succinilo. El orden de las bases nucleotídicas simples en la corriente 1, que se encuentra aguas abajo de la microperla, corresponde a la secuencia del analito. 1 emerge de un cabezal de gotitas 2 en una primera cámara 3 en la que se pone en contacto el mismo con una o más corrientes de aceite de silicona ligero inmiscible 4. Las velocidades de estas corrientes se seleccionan a fin de evitar una mezcladura turbulenta y para crear gotitas acuosas esféricas 5 suspendidas en el aceite, cada una de las cuales tiene un diámetro de aproximadamente 8 micrómetros. Típicamente, las velocidades se ajustan de modo que entre las gotitas llenas adyacentes existan otras vacías 10. Una corriente de 5 se hace avanzar luego a lo largo de un segundo tubo de naturaleza microfluida del mismo diámetro a una velocidad de 1000 gotitas por segundo a una segunda cámara 6 a la cual se alimenta también una segunda corriente de gotitas acuosas esféricas 7 de cinco micrómetros por medio de un segundo cabezal de gotitas 8. Las gotitas 5 y 7 se ven obligadas a fusionarse de manera secuencial para formar gotitas acuosas agrandadas 9 de aproximadamente nueve micrómetros de diámetro. Cada una de 7 contiene pirofosfatasa para destruir cualquier anión pirofosfato residual presente en cada una de 5.

Se hace avanzar luego una corriente de 9 a la misma velocidad por un tubo microfluida hasta una tercera cámara 10 en la que estas gotitas se ponen en contacto con una tercera corriente de gotitas esféricas acuosas 11 de cinco micrómetros, alimentadas también a la misma por un cabezal de gotitas correspondiente 12. El tiempo requerido para que cada una de 9 se desplace entre las cámaras 6 y 10 es aprox. 2 minutos.

Las gotitas 9 y 11 se ven obligadas a fusionarse luego en 10 para producir gotitas 13 (de aproximadamente diez micrómetros de diámetro). Cada una de 11 contiene una ligasa mesófila y un sistema de captura que comprende pares de cuatro primeros oligonucleótidos en forma de j y cuatro segundos oligonucleótidos monocatenarios correspondientes. Cada primer oligonucleótido en forma de j tiene una longitud de 60 bases nucleotídicas y se prepara por plegado de un precursor de oligonucleótido monocatenario de 60 bases nucleotídicas alrededor de la base nucleotídica 45ª desde el extremo 5' para generar un bucle monocatenario de 3 bases nucleotídicas, una región bicatenaria de 12 pares de bases nucleotídicas y una región monocatenaria de 33 bases nucleotídicas que es diferente en cada uno de los cuatro primeros oligonucleótidos. Cada uno de estos cuatro primeros oligonucleótidos tiene también una base 33ª diferente (medida desde el extremo monocatenario) característica de los cuatro tipos de bases nucleotídicas característicos del DNA (a saber, A, T, G, y C). Los cuatro segundos oligonucleótidos diferentes tienen cada uno una longitud de 28 bases nucleotídicas y tienen secuencias diferentes que son complementarias a la parte de la región monocatenaria definida por las bases nucleotídicas 4ª y 32ª de su primer par oligonucleotídico.

Una corriente de 13 se lleva luego adelante a la misma velocidad por una tubería de naturaleza microfluida en la que, después de 30 minutos, se hace pasar aquella a través de un punto caliente, en el que se hace que la ligasa se desactive (10 a 20 minutos), antes de entrar en una tercera cámara 14 en la que se hace que aquella se fusione con una cuarta corriente de gotitas esféricas acuosas 15 de cinco micrómetros alimentadas también a la misma a través de un cabezal de gotitas 16. Cada una de 15 contiene cuatro pares de cebadores diferentes selectivos para cada uno de los segundos oligonucleótidos, enzima *Taq Pol*, los cuatro desoxirribonucleotido-trifosfatos característicos del DNA y 4 balizas moleculares diferentes selectivas para cada uno de los 4 tipos de amplicones que pueden generarse a partir de las 4 moléculas diferentes capturadas susceptibles de ser producidas en 13. 15 puede contener también otros aditivos empleados típicamente en la realización de la reacción en cadena de la polimerasa. La corriente de las microgotitas fusionadas 17 así formada se somete luego a entre 20 y 30 ciclos térmicos de entre 60 y 95°C (aproximadamente 1 ciclo por minuto) durante cuyo tiempo tiene lugar la amplificación de la molécula de captura descomprimida por la reacción en cadena de la polimerasa. Al terminar este tiempo, 17 se transfiere al sistema de detección.

El sistema de detección (no representado) comprende típicamente una ventana de detección en la cual cada gotita es investigada con luz incidente procedente de un láser. La acción de esta luz causa entonces que las balizas moleculares activadas en cada gotita emitan fluorescencia de manera característica de la base nucleotídica simple que estaba incorporada originalmente en la molécula capturada (o esencialmente nada en absoluto si la gotita estaba originalmente vacía). La presencia o ausencia de esta fluorescencia se detecta luego a las cuatro longitudes de onda características de las 4 balizas moleculares arriba mencionadas. Así, a medida que las gotitas son investigadas sucesivamente, la secuencia de bases nucleotídicas en el analito polinucleotídico original puede ser interpretada eficazmente. Aunque la aparición de fluorescencia es generalmente rápida, cada gotita se investiga sólo después que han transcurrido 10 minutos a fin de asegurarse de que las gotitas vacías se identifican fiablemente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Base4 Innovation Limited Medical Research Council
- <120> Método de detección de nucleótidos simples
- <130> P57530WO

ES 2 559 108 T3

<150> GB 1306445.6
 < 151> 2013-04-09

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1
 < 211> 75
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial

10 <220>
 < 223> Precursor nucleotídico en forma de j

<220>
 < 221> Característica mixta
 < 222> (74)..(75)
 < 223> Enlace fosforotioato

15 <400> 1
 gtaggtcctg gcacagaaaa aaggaggcag tgatgttcca tgactgattt ttttttcagt 60
 catggaacat cactg 75

<210> 2
 < 211> 26
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial

20 <220>
 < 223> Región oligonucleotídica monocatenaria residual del oligonucleótido en forma de j

<400> 2
 gtaggtcctg gcacagaaaa aaggag 26

25 <210> 3
 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial

30 <220>
 < 223> Oligonucleótido monocatenario

<220>
 < 221> Característica mixta
 < 222> (5)..(6)
 < 223> Bases timina marcadas con Alexa Fluor 488 por enlazador azida

35 <220>
 < 221> Característica mixta
 < 222> (7)..(7)
 < 223> Base timina marcada con atenuador BHQ-1

40 <220>
 < 221> Característica mixta
 < 222> (8)..(9)
 < 223> Bases timina marcadas con Alexa Fluor 488 por enlazador azida

45 <400> 3
 ctctttttt ctgtgccaga 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinación de la secuencia de bases nucleotídicas en un analito polinucleotídico caracterizado por los pasos de (1) generar una corriente de trifosfatos nucleotídicos monobásicos a partir del analito por pirofosforólisis progresiva en presencia de una enzima de pirofosforólisis; (2) producir moléculas capturadas por reacción de cada trifosfato nucleotídico monobásico en presencia de una polimerasa y una ligasa con un sistema de captura constituido por: (i) (a) un primer oligonucleótido que comprende una región bicatenaria y una región monocatenaria y (b) un segundo oligonucleótido monocatenario cuya secuencia de bases nucleotídicas es al menos parcialmente complementaria a la de la región monocatenaria del primer oligonucleótido; o (ii) un oligonucleótido simple que comprende una región nucleotídica monocatenaria cuyos extremos están unidos a dos regiones oligonucleotídicas bicatenarias diferentes; (3) amplificar al menos parte de la molécula capturada para producir una pluralidad de amplicones característicos del trifosfato nucleotídico monobásico simple, (4) marcar los amplicones con una sonda correspondiente que tiene un elemento característico detectable y (5) detectar una propiedad característica del elemento detectable.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1 caracterizado por que el ordenamiento de las bases nucleotídicas en la corriente corresponde a la secuencia de bases nucleotídicas en el analito.
- 15 3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 caracterizado por que el sistema de captura (i) está constituido por dos componentes para cada tipo de trifosfato de base nucleotídica.
- 20 4. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 caracterizado por que el sistema de captura (ii) comprende un solo oligonucleótido para cada tipo de trifosfato de base nucleotídica.
- 25 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el analito polinucleotídico está fijado a una superficie.
- 30 6. Un método según reivindicación 1 caracterizado por que la enzima de pirofosforólisis no exhibe comportamiento alguno de exonucleasa ni endonucleasa en las condiciones de reacción del paso (1).
- 35 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el paso (1) se lleva a cabo en condiciones distintas del equilibrio en presencia de un medio acuoso fluyente que comprende la enzima de pirofosforólisis, anión pirofosfato y cationes magnesio, y en el que las bases nucleotídicas simples se retiran continuamente de la zona de reacción en la que se generan las mismas.
- 40 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que entre los pasos (1) y (2) cualquier anión pirofosfato residual se destruye por medio una pirofosfatasa.
- 45 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 8 caracterizado por que en el sistema de captura (i) el primer oligonucleótido tiene forma de j.
- 50 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 9 caracterizado por que en el sistema de captura (i) la longitud total del primer oligonucleótido es de 20 a 100 bases nucleotídicas.
- 55 11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 10 caracterizado por que el sistema de captura (i) comprende cuatro tipos diferentes de segundos oligonucleótidos cada uno de los cuales tiene una secuencia complementaria a una parte de una de las cuatro regiones monocatenarias diferentes en los cuatro primeros oligonucleótidos diferentes.
- 60 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 8 caracterizado por que en el sistema de captura (ii) cada región oligonucleotídica bicatenaria está constituida por 10 a 30 pares de nucleótidos.
- 65 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 8 y 12 caracterizado por que en el sistema de captura (ii) se emplean dos regiones oligonucleotídicas bicatenarias discretas cada una de las cuales comprende extremos alejados de la región nucleotídica monocatenaria que forman un bucle cerrado.
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 8, 12 y 13 caracterizado por que en el sistema de captura (ii) las regiones oligonucleotídicas bicatenarias pueden derivarse de un precursor oligonucleotídico monocatenario por plegado de los extremos sobre sí mismos para dejar un espacio que comprende la región nucleotídica monocatenaria.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el sistema de captura comprende al menos dos tipos de sistema de captura diferentes, siendo cada tipo selectivo para una base nucleotídica diferente.

16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que los pasos (3) y (4) se llevan a cabo simultáneamente.
- 5 17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que la amplificación en el paso (3) se realiza utilizando un método seleccionado de la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación de la recombinasa-polimerasa y amplificación en círculo rodante.
- 10 18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que la ligasa empleada en el paso (2) se desactiva antes que tenga lugar el paso (4).
- 15 19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que la sonda utilizada en el paso (4) se selecciona de balizas moleculares, sondas Taqman y sondas escorpión.
20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el paso (5) comprende detectar la fluorescencia emitida por fluoróforos en la sonda activada.
21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que al menos uno de los pasos (1) a (5) se realiza en microgotitas.

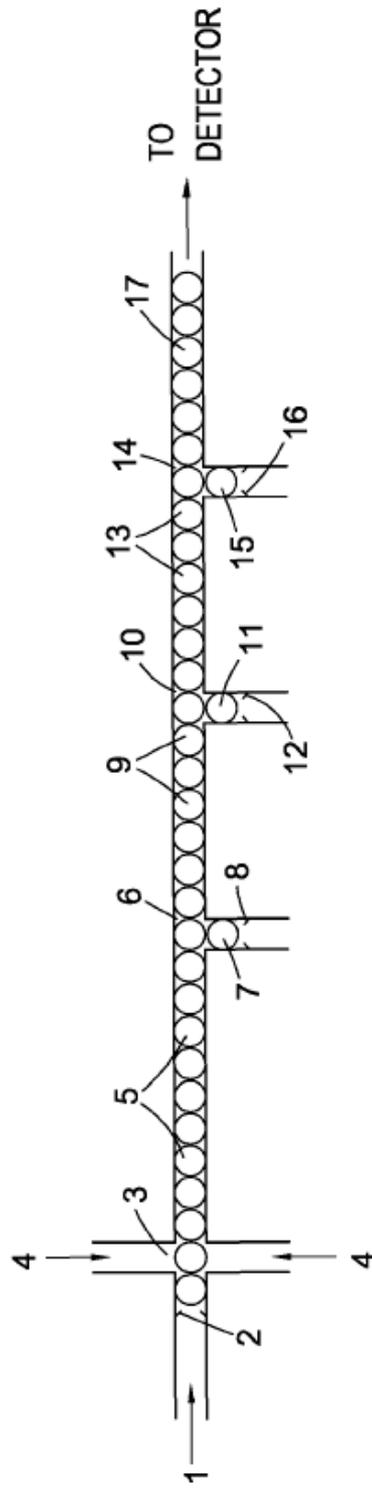


Fig. 1