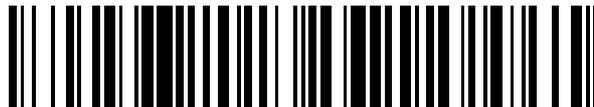


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 426**

51 Int. Cl.:

C07H 19/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09736673 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2346889**

54 Título: **Diseño, síntesis y uso de nucleótidos sintéticos que comprenden grupos informadores iónicos**

30 Prioridad:

03.09.2008 US 94025 P

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

26.02.2016

73 Titular/es:

**QUANTUMDX GROUP LIMITED (100.0%)
Lugano Building, 57 Melbourne Street
Newcastle upon Tyne NE1 2JQ, GB**

72 Inventor/es:

O'HALLORAN, JONATHAN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 561 426 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

Diseño, síntesis y uso de nucleótidos sintéticos que comprenden grupos informadores iónicos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

[0001] Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren, de manera general, a nucleótidos sintéticos que comprenden nucleótidos con una molécula informadora de masa de carga, a través de una molécula enlazadora larga. La longitud de las moléculas enlazadoras puede variar, en parte para hacer posible que la fracción informadora se extienda hacia afuera desde el complejo ADN polimerasa, de modo que algunos aspectos de la polimerización no se vean influenciados entera o parcialmente.

Descripción de la técnica relacionada

[0002] Un nucleótido puede definirse como un éster fosfato de un nucleósido que comprende una base purina o pirimidina unida a fosfatos de ribosa o de desoxirribosa. Los nucleótidos purínicos tienen sobre todo adenina (A) o guanina (G) como base, y los nucleótidos pirimidínicos tienen como base citosina (C), timina (T) o uracilo (U), y son las unidades repetitivas básicas contenidas en el ADN y el ARN (*Henderson's dictionary of biological terms*, 1989).

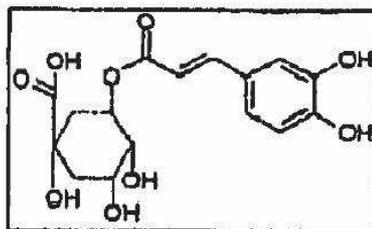
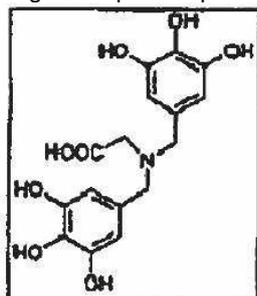
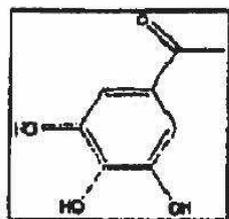
[0003] El ADN es un polímero largo que comprende unidades de desoxirribonucleótidos y el ARN es un polímero de ribonucleótidos. La secuencia de las bases de los nucleótidos puede determinar las características hereditarias de cada individuo.

[0004] El dogma central de la biología molecular describe de manera general el flujo normal de la información biológica: el ADN puede replicarse para formar ADN, la información genética del ADN puede "transcribirse" a ARNm y las proteínas pueden traducirse a partir de la información contenida en el ARNm, en un proceso denominado traducción, en el que las subunidades de las proteínas (los aminoácidos) se acercan lo suficiente para unirse, siguiendo un orden (dictado por la secuencia del ARNm y, por lo tanto, del ADN) mediante la unión del ARNt (cada ARNt porta un aminoácido concreto que depende de su secuencia) al ARNm.

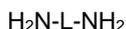
RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición informadora que es un sustrato de una polimerasa y que comprende:

- un nucleótido;
- una fracción de masa de carga alta que comprende uno o más de los siguientes grupos;



y una molécula enlazadora, y dicha molécula enlazadora es una molécula que tiene la siguiente fórmula general:



en la que L es de 1 a 100 grupos alquilo, grupos oxialquilo o combinaciones de los mismos, y -NH₂ puede sustituirse con cualquier grupo funcional que puede unirse, mediante enlace(s) cruzado(s), al nucleótido y a la fracción de masa de carga alta, y el enlazador se une tanto al nucleótido como a la fracción de masa de cargas alta;

y la molécula enlazadora (enlazador) o la fracción de masa de carga alta se configura de manera que no afecta a la polimerización de los nucleótidos por parte de una polimerasa ni a las uniones hidrógeno (enlaces de hidrógeno) entre la base del nucleótido cuando se hibrida con su complemento presente en otro polímero de nucleótidos; y

la fracción de masa de carga alta comprende una masa de carga suficiente para que el acoplamiento de la composición informadora a una nanoestructura genere un cambio medible en la carga superficial asociada a dicha nanoestructura.

[0006] En algunas realizaciones, el nucleótido presente en la composición informadora puede seleccionarse del grupo que comprende un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido y un treosa-nucleótido.

5

[0007] La molécula enlazadora y/o la fracción de masa de carga alta se configuran de manera que no afecten a la polimerización de los nucleótidos por parte de una polimerasa y, además, se puedan retirar. La molécula enlazadora se puede unir a un grupo fosfato, grupo azúcar, o base del nucleótido o su derivado.

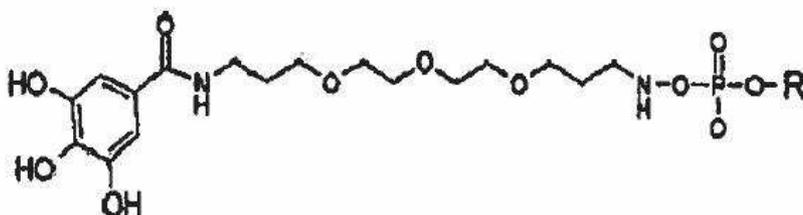
10

[0008] En algunas realizaciones, la fracción de masa de carga alta presente en la composición informadora puede ser positiva o negativa, y además, dicha masa de carga de dicha fracción puede ser variable en función del pH.

15

[0009] Además, el número de dichos grupos, de los derivados de los mismos y de las combinaciones de los mismos, presente en la fracción de masa de carga alta, puede ser de 1 a 10, de 11 a 50, de 51 a 100, o más de 100 en diversas realizaciones.

[0010] En otro aspecto de la presente invención, una composición informadora puede comprender la siguiente molécula:

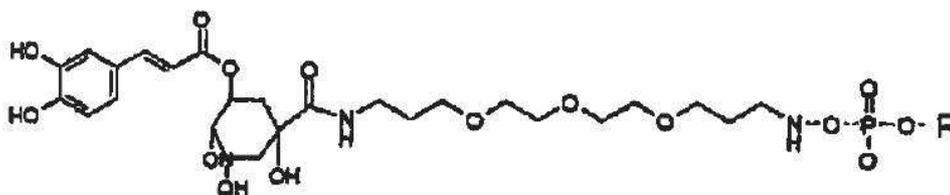


o;

20

en la que R se selecciona del grupo que comprende un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido y un treosa-nucleótido.

[0011] En otro aspecto más de la presente invención, una composición informadora puede comprender la siguiente molécula:



25

en la que R se selecciona del grupo que comprende un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido y un treosa-nucleótido.

[0012] Un kit con el que determinar una secuencia de nucleótidos, que comprende la composición informadora de la presente invención. [0013] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para sintetizar la composición informadora de cualquiera de las Reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 5, y dicho método comprende:

30

generar una primera unión covalente entre el nucleótido y un primer grupo amino del enlazador, y en este caso, un grupo fosfato, un azúcar o una base del nucleótido se une al primer grupo amino del enlazador; y

35

generar una segunda unión covalente entre un segundo grupo amino del enlazador y un grupo funcional presente en la fracción de masa de carga alta;

y, en este caso, el enlazador comprende al menos dos grupos amino.

40

[0013] En algunas realizaciones, el nucleótido empleado en el método puede comprender un grupo monofosfato. En algunas otras realizaciones, el nucleótido empleado en el método se puede seleccionar del grupo que comprende adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP), citidina monofosfato (CMP), timidina monofosfato (TMP) y uridina monofosfato (UMP).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

5 **[0014]** La secuenciación del genoma humano y los estudios posteriores han revelado el enorme valor que tiene conocer la secuencia del ADN de una persona. La información que se obtiene mediante el análisis de la secuencia del ADN genómico puede brindar información sobre el riesgo relativo que un individuo tiene de desarrollar determinadas enfermedades (como en el caso del cáncer de mama y los genes BRCA1 y BRCA2). Además, el análisis del ADN tumoral puede proporcionar información acerca de la fase y el grado de dichos tumores.

10 **[0015]** Las enfermedades infecciosas, tales como las causadas por virus o bacterias, también llevan su información genética en los genomas, integrados por polímeros de nucleótidos (ADN o ARN). En la actualidad, muchos de dichos genomas ya están secuenciados (o se ha secuenciado una parte del genoma suficiente para hacer posible la producción de una prueba diagnóstica), y el análisis de los genomas de los agentes de diversas enfermedades infecciosas a partir de muestras clínicas (una disciplina llamada diagnóstico molecular) se ha convertido en uno de los métodos más importantes de diagnóstico sensible y específico de enfermedades.

15 **[0016]** Las mediciones de la presencia o ausencia, así como de la abundancia de especies de ARNm en las muestras, puede brindar información sobre el estado de salud de los individuos, la fase de la enfermedad y el pronóstico, así como información farmacogenética y farmacogenómica. Estos conjuntos de expresión se están convirtiendo, rápidamente, en herramientas en la lucha contra las enfermedades complejas, y pueden empezar a gozar de más popularidad a medida que sus precios empiecen a reducirse.

20 **[0017]** En definitiva, el análisis de los polímeros de nucleótidos (ADN y ARN) se ha vuelto importante en la rutina clínica, aunque su coste sigue representando una dificultad para su adopción generalizada en todo el mundo. Uno de los motivos de su alto coste reside en la complejidad de los análisis, que hace necesario usar dispositivos complejos capaces de medir, con sensibilidad, un total de hasta cuatro canales de fluorescencia diferentes, a medida que se llevan a cabo los experimentos de RT-PCR (transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa). En el caso de las alternativas menos costosas, pueden necesitarse técnicos experimentados para manejar e interpretar equipos de tecnología no avanzada (por ejemplo, geles de electroforesis), pero eso también puede resultar caro y, en los países en desarrollo, la falta de técnicos experimentados impide la aplicación de estas alternativas.

25 **[0018]** Para resolver todo esto, puede ser necesario un método de análisis de polímeros de nucleótidos para el que solo sea necesario utilizar dispositivos baratos y fáciles de usar. Algunas realizaciones de la presente descripción describen reactivos químicos –nucleótidos sintéticos– que, en general, se pueden usar en tales dispositivos. Diversas realizaciones empleadas en conexión con la presente descripción describen novedosos nucleótidos sintéticos que comprenden al menos algunos nucleótidos estándar (o con modificaciones, o isoformas), con una fracción informadora de alta masa de carga negativa unida mediante una molécula enlazadora (por ejemplo, unida al grupo 5'-fosfato), y la longitud del enlazador es tal que sobresale de un complejo polimerasa durante la polimerización, de manera que no ejerce un efecto deletéreo de importancia sobre la acción de la polimerasa.

30 **[0019]** Tal y como se usa en diversas realizaciones que aquí se presentan, un nucleótido puede ser, entre otras posibilidades, uno de los siguientes compuestos: adenina, guanina, citosina, timina, uracilo e inosina, así como nucleótidos modificados, derivados de nucleótidos, y nucleótidos con bases degeneradas. Algunos ejemplos de tal nucleótido pueden comprender un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido, y un treosa-nucleótido. Además, el ácido desoxirribonucleico de una sola cadena (ssADN, por sus siglas en inglés) puede ser, por lo general, una molécula polimérica nucleotídica de una sola cadena, que comprende nucleótidos, y el ácido desoxirribonucleico de cadena doble (dsADN) puede ser, por lo general, una cadena doble que comprende dos moléculas de ssADN unidas mediante, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, en una orientación complementaria inversa.

35 **[0020]** En general, los nucleótidos pueden sintetizarse mediante diversos métodos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ello puede comprender la denominada síntesis con recuperación (la reutilización de partes de nucleótidos en la resíntesis de nucleótidos nuevos, mediante reacciones de degradación y de síntesis, a fin de intercambiar partes útiles), o el uso de grupos protectores, en un laboratorio. En este último caso, se pueden proteger un nucleósido o base nucleica purificados para crear una fosforamidita, y se pueden usar para obtener análogos no presentes en la naturaleza y/o para crear un oligonucleótido.

40 **[0021]** En algunas realizaciones, la síntesis de nucleótidos comprende la formación de un nucleósido (la base nitrogenada unida a un azúcar). El azúcar implicado en la síntesis y en la estructura de un nucleótido puede ser ribosa o desoxirribosa; en este último caso, se puede añadir el prefijo “desoxi” antes del nombre del nucleósido (en todos los casos excepto en el caso del uracilo). Después, se puede esterificar al azúcar un grupo fosfato funcional, creando así un nucleótido. El grupo fosfato puede comprender uno, dos o tres fosfatos, formando monofosfatos, difosfatos o trifosfatos, respectivamente.

45 **[0022]** Algunas otras realizaciones de la presente descripción describen el diseño, la síntesis y el uso de nucleótidos sintéticos especiales que comprenden un nucleótido y una fracción informadora (y la fracción informadora no puede actuar como una fracción bloqueadora de la enzima polimerasa), unidos mediante un enlazador.

[0023] Una fracción informadora o composición informadora empleada en diversas realizaciones en conexión con las presentes invenciones [sic] es una molécula o moléculas que son detectadas con facilidad por un biosensor u otro método de detección (por ejemplo, mediante la vista) y que se unen a biomoléculas o a sondas o a cebadores que detectan o amplifican las moléculas de interés.

[0024] Una molécula enlazadora, que se usa en diversas realizaciones, es un polímero compuesto de más de una subunidad, que une una molécula informadora a un nucleótido. Un ejemplo de una molécula enlazadora es un enlazador diamina $H_2N - L - NH_2$, donde L representa una serie de subunidades adicionales.

[0025] Se debe considerar que la presente descripción incluye todas las configuraciones que incluyen algún nucleótido, o derivado de nucleótido, con una molécula enlazadora unida a una fracción informadora con una carga total lo suficientemente alta para que se obtenga un cambio detectable por un biosensor sensible capaz de detectar pequeñas variaciones en la masa de carga en su superficie o cerca de ésta. De igual modo, se debe considerar que los diversos ejemplos que se presentan en esta solicitud se presentan únicamente a título ilustrativo, y que no limitan el ámbito de la invención.

[0026] En diversas realizaciones, los nucleótidos sintéticos pueden tener al menos algunas de las siguientes características:

1. Las fracciones informadoras informan basándose en su masa de carga, y no en su actividad enzimática, fluorescencia, etc.;
2. Cada nucleótido sintético puede portar una fracción informadora con la misma masa de carga, o portar una masa de carga diferente;
3. Las fracciones informadoras pueden escindirse con facilidad; y/o
4. Los nucleótidos pueden sintetizarse en masa, de manera sencilla y barata.

[0027] Hay varias posiciones posibles disponibles para la unión de enlazadores y fracciones informadoras. Es importante unir el enlazador de manera tal que no interfiera con la polimerización ni con los enlaces de hidrógeno entre las bases de los nucleótidos cuando se hibridan con sus bases complementarias en otro polímero de nucleótidos (es decir, cuando dos cadenas de ADN complementario inverso se hibridan y forman una molécula de ADN de cadena doble). Una posición posible puede ser la unión fosfato en el nucleótido. Además, fijando el enlazador a la posición 5' del fosfato, se bloquean adiciones de nucleótidos adicionales, puesto que se impide la formación de una unión fosfodiéster.

[0028] Otras posiciones posibles disponibles para la unión de enlazadores y fracciones informadoras, son el grupo azúcar o el grupo base nitrogenada.

[0029] Algunas otras realizaciones describen métodos de uso mediante los que se puede escindir el enlazador y la fracción informadora del nucleótido sintético de manera iterativa tras la detección. Dado que uno de los lugares posibles a los que unir el enlazador es el extremo 5'-fosfato del grupo fosfato, y dado que así se impide la adición de nucleótidos adicionales, la escisión del enlazador elimina ese bloqueo y permite la adición de nucleótidos adicionales.

[0030] A modo de ejemplo, hay al menos dos opciones disponibles que podrían facilitar la síntesis en el extremo 5'-fosfato-terminal:

1. Tiofosfato; y/o
2. Fosforamidato.

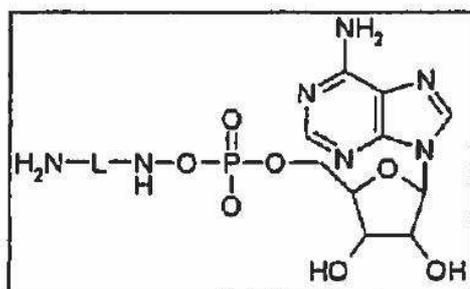
[0031] Por lo tanto, el enlazador propuesto puede tener la siguiente estructura (al menos, en algunas realizaciones):



donde L es una molécula de cadena lineal o ramificada de 1 a 100 grupos alquilo, grupos alquiloxi o combinaciones de ambos grupos. En otra realización, el número de grupos alquilo, grupos alquiloxi o combinaciones de ambos grupos, en L, es de 1 a 75. Y en otra realización, el número de grupos alquilo, grupos alquiloxi o combinaciones de ambos grupos en L, es de 1 a 50. Y en otra realización, el número de grupos alquilo, grupos alquiloxi o combinaciones de ambos grupos en L, es de 1 a 25. En la estructura indicada, NH_2 se presenta a título ilustrativo, y puede sustituirse con cualquier otro grupo funcional que pueda unirse, mediante enlaces cruzados, a un nucleótido o derivado de nucleótido, así como a una fracción de masa de carga alta, y tanto dicho nucleótido o derivado y dicha fracción están presentes en un nucleótido sintético. Algunos ejemplos ilustrativos que pueden usarse en vez del NH_2 incluyen, entre otras posibilidades, un grupo carboxilo (es decir, $COOH$), un grupo amida (es decir, $CONH$), y derivados de dichos grupos. La longitud de las moléculas enlazadoras puede variar, y su estructura química también; en parte, para hacer posible que la fracción informadora sobresalga del complejo nucleótido-polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa y otras), de manera que algunos aspectos de la polimerización no puedan verse influenciados ni entera ni parcialmente.

[0032] Un fácil acceso a enlazadores de diversas longitudes puede considerarse una ventaja en una situación en la que la longitud deseada del enlazador puede no conocerse entera o parcialmente. Esto puede facilitar los experimentos de optimización.

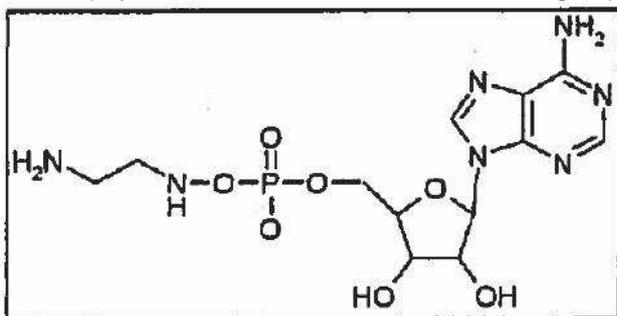
5 [0033] Por lo tanto, el enlazador con el nucleótido (digamos, adenosina, como ejemplo ilustrativo) puede tener la siguiente estructura, al menos en algunas realizaciones. Si bien en algunos de los ejemplos que se presentan a continuación, se usa la adenosina, en algunas otras realizaciones dicha adenosina puede sustituirse con cualquier otro nucleótido natural o sintético, y con modificaciones o derivados de los mismos.



10

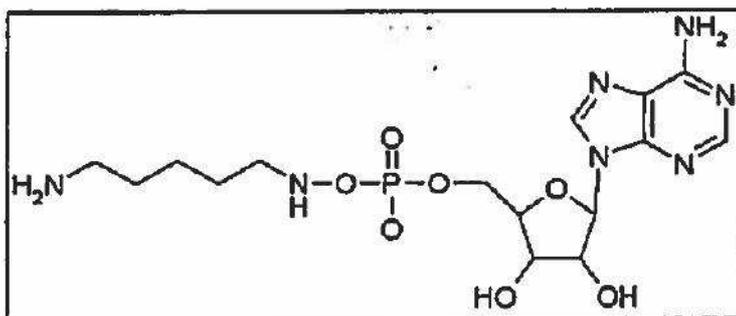
[0034] En algunas realizaciones, enlazadores de diversas longitudes en esta posición pueden tener las siguientes estructuras (ejemplificadas aquí con adenosina):

1. Etilendiamina (separación de 2 enlaces de carbono de longitud)

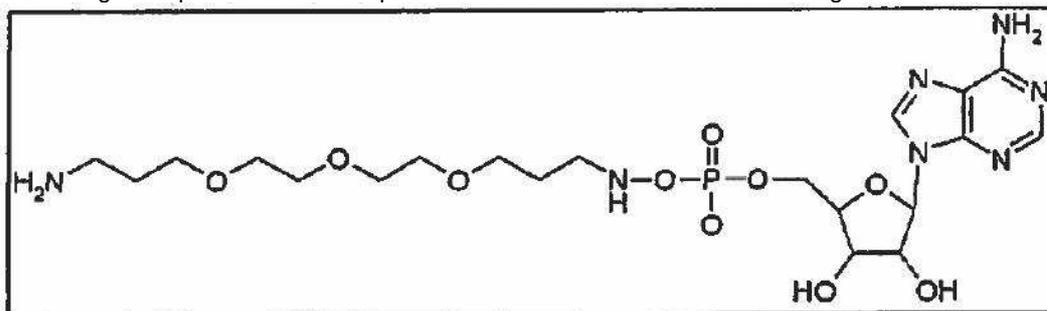


15

2. Pentanodiamina (separación de 5 enlaces de carbono de longitud)



3. Longitud equivalente a una separación de 13 enlaces de carbono de longitud



20

[0035] Por lo tanto, en algunas realizaciones, los enlazadores así seleccionados pueden:

1. Estar fácilmente disponibles;
2. Ser fáciles de unir y escindir (consúltense los protocolos probables, más adelante); y/o
3. No interactuar con la polimerasa ni con la cadena de ácido polinucleico y/o no afectar a la polimerización de nucleótidos ni al crecimiento de un polímero de nucleótidos naciente.

5

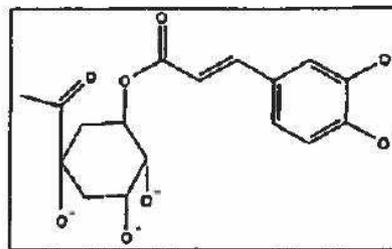
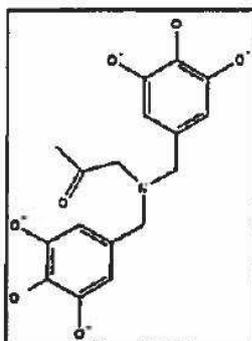
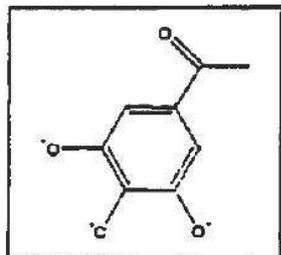
[0036] La fracción informadora: Tal y como se usa en la presente invención, una "fracción informadora" es una molécula o moléculas que es/son detectada/s fácilmente por un biosensor u otro método de detección (por ejemplo, mediante la vista) y que se une/n a biomoléculas o a sondas o a cebadores que detectan o amplifican moléculas de interés que, normalmente, son difíciles de detectar sin la presencia de una fracción informadora que "informe" de su presencia. La manera en la que "informan" es mediante su carga, que es detectada por biosensores sensibles, que detectan la carga, tales como nanoalambres/nanotubos con efecto campo (FETs), nanoporos y otros biosensores piezoeléctricos. En algunas realizaciones se pueden asociar las fracciones informadoras a otras propiedades, tales como naturaleza cromofórica, a fin de posibilitar su detección por un detector de luz UV o de luz visible, o como naturaleza fluorescente, de modo que sean detectadas mediante fluorimetría. Además, se puede aprovechar la masa de la fracción informadora mediante biosensores capaces de detectar la masa, tales como biosensores de resonancia de plasmón de superficie y sensores basados en cantilévers.

[0037] La carga del informador: ciertas realizaciones de la presente invención describen una fracción informadora que porta una masa de carga grande. En una realización, la fracción informadora puede introducir una masa de carga, en el nucleótido sintético, más alta que la masa de carga del nucleótido que está presente en el nucleótido sintético. No obstante, en otra realización, la masa de carga introducida por la fracción informadora puede ser esencialmente igual o inferior a la masa de carga del nucleótido que está presente en el nucleótido sintético.

[0038] La carga presente en la fracción puede ser positiva o negativa.

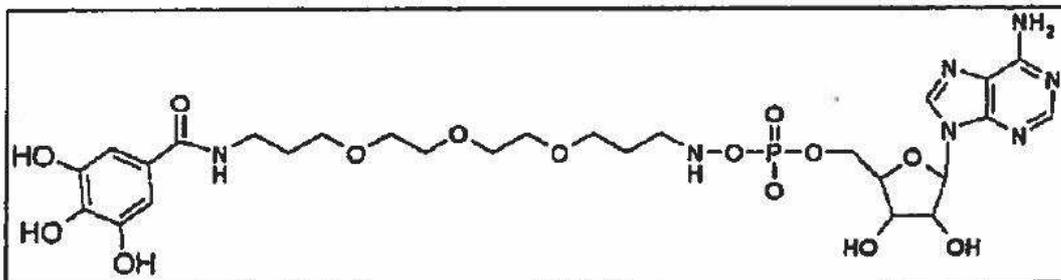
[0039] Además, al menos debido en parte a la estabilidad de esta unión frente a un pH alcalino (superior a 7), el proceso de inducción de carga negativa no ejercería interferencia alguna, o ejercería únicamente una interferencia esencialmente escasa.

[0040] Mientras que el informador-1 y el informador-3 pueden estar disponibles comercialmente, es posible que el informador-2 se deba sintetizar a medida, y los informadores 1, 2 y 3 tienen las siguientes estructuras:

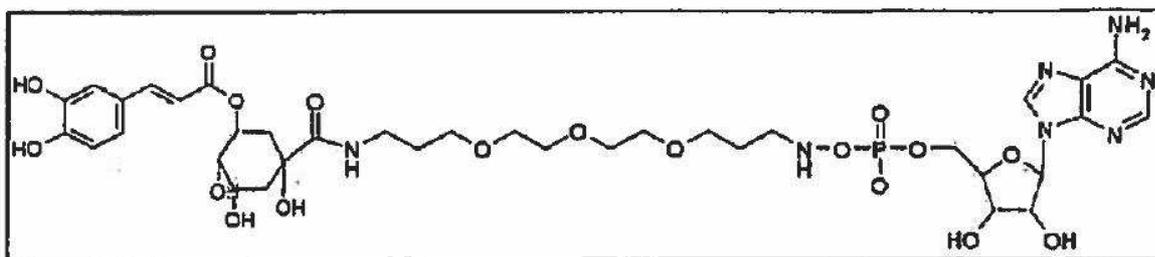


[0041] Compuestos (monómeros) finales: Las estructuras finales de los nucleótidos, junto con los enlazadores y los informadores, serían las siguientes, al menos en ciertas partes de las realizaciones. También los siguientes ejemplos de algunos compuestos finales se proporcionan a título ilustrativo y, por lo tanto, no debe considerarse que limiten el alcance de la invención. Como se ha descrito anteriormente en esta solicitud, las variaciones permitidas para un nucleótido, un enlazador y una fracción informadora de alta masa de carga también están permitidas para un compuesto final. Por lo tanto, en el caso de la adenosina como nucleótido en el extremo 5'-fosfato-terminal en algunos ejemplos, si el enlazador es, digamos, equivalente a C13 (la opción 3 antes expuesta), los diversos enlazadores harían que las estructuras finales fuesen como se indica a continuación:

[0042] Un nucleótido sintético-2 propuesto (obsérvese que el informador está en forma de monómero y que esto puede aumentarse añadiendo estos monómeros a fin de incrementar la masa de carga en la medida de lo necesario):



[0043] Otro nucleótido sintético-3 propuesto (obsérvese que el informador está en forma de monómero y que esto puede aumentarse añadiendo estos monómeros a fin de incrementar la masa de carga en la medida de lo necesario):



5

[0044] El siguiente es un ejemplo ilustrativo, no limitador, de protocolos de síntesis empleados en al menos algunas realizaciones:

10

1. Síntesis de 5'-fosforamidatos de adenosina: (Unión del nucleótido con el enlazador diamina). Para sintetizar derivados 5'-amino de la adenosina fosforamidato, en donde las diaminas y la adenosina monofosfato (AMP) pueden disolverse en agua, puede utilizarse el método de Chu *et al.* Posteriormente, se añadió EDAC y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante. Se vigiló la reacción hasta que se terminó de llevar a cabo.

15

2. Síntesis de las estructuras finales propuestas: (Unión del enlazador diamina con la fracción informadora). Para sintetizar derivados 5'-amino de la adenosina fosforamidato, en donde las diaminas y la adenosina monofosfato (AMP) pueden disolverse en agua, puede utilizarse el método de Chu *et al.* Posteriormente, se añadió EDAC y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante. Se vigiló la reacción hasta que se terminó de llevar a cabo.

20

[0045] Una ventaja del procedimiento similar es que puede funcionar para los dos pasos que conducen a la formación de los compuestos finales en forma de monómeros.

25

[0046] En algunos ejemplos ilustrativos de algunas realizaciones (véase más adelante), puede ser necesario llevar a cabo la escisión de los enlazadores y de las fracciones informadoras. Por lo general, las uniones tales como los fosforamidatos pueden escindirse con bastante facilidad usando ácidos como el ácido trifluoroacético a temperatura ambiente.

30

[0047] La distancia aproximada entre el fosforamidato y el átomo cargado terminal puede ser de unos 20 angstroms, lo que, en general, podría ser suficiente para inducir potencial de carga en la superficie, para su detección. Dicha distancia puede ser modificada adicionalmente, con modificaciones adicionales en la fase, al menos en parte, cambiando las longitudes de los enlazadores. Además, la carga de las fracciones informadoras terminales puede ser modificada por variaciones en la química de las fracciones informadoras.

35

[0048] En una realización, la composición informadora citada en las reivindicaciones anexas comprende cualquier nucleótido con una molécula enlazadora escindible unida a una fracción de masa de carga alta, y el nucleótido sintético (también denominado "la composición informadora") tiene una carga que es suficiente para ocasionar un cambio detectable en la propiedad de una nanoestructura detectora sensible, cuando la composición informadora se une operativamente a dicha nanoestructura (como, por ejemplo, mediante la adición del nucleótido sintético (la composición informadora) a una cadena naciente durante una secuenciación realizada por un procedimiento de síntesis).

40

EJEMPLOS

[0049] La siguiente descripción es un ejemplo ilustrativo de algunas realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1 - Secuenciación de ADN

45

[0050] La metodología de secuenciación que se emplee en un ejemplo puede no hacer uso de la fluorescencia, ni de costosas cámaras sensibles; en vez de eso, puede detectar la adición de los nucleótidos sintéticos que se describen en

algunos aspectos de la presente invención, mediante, al menos en parte, la detección de la carga eléctrica de la fracción informadora, a través de nanoestructuras sensibles que puedan ser capaces de detectar una acumulación de masa de carga en sus superficies o cerca de éstas. Cuando se añade un nucleótido nuevo al polímero en crecimiento en una secuencia mediante reacción de síntesis, la densidad de carga en la superficie de la nanoestructura sensible, o cerca de ésta, puede aumentar, y ese aumento puede ser detectado en virtud de un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible detectora (por ejemplo, si se usa un nanoalambre o un nanotubo de carbono como la estructura detectora, un aumento de la carga, ocasionado por la adición de un nucleótido cerca de la superficie de dicha estructura detectora, puede ser detectado a través de cambio en la resistencia del alambre, gracias a un fenómeno denominado “efecto campo”). Sin embargo, a medida que el polímero crece, la señal puede disminuir, dado que las cargas que portan los nucleótidos que se van añadiendo pueden estar demasiado lejos de la nanoestructura sensible (por ejemplo, un nanoalambre) como para producir un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible detectora, por lo que es posible que no se observe señal alguna. Por eso, la “longitud de lectura” (la cantidad de datos sobre la secuencia que resulta posible obtener mediante este método de secuenciación de nucleótidos) puede verse limitada.

[0051] Tal y como se usa en la presente invención, una “nanoestructura sensible detectora” puede ser cualquier estructura (a nanoescala o no) que pueda ser capaz de detectar un cambio en la carga en su superficie o cerca de ésta y que pueda tener, en cualquiera de sus puntos, al menos una dimensión transversal inferior a unos 500 nanómetros, habitualmente inferior a unos 200 nanómetros, más habitualmente inferior a unos 150 nanómetros, aún más habitualmente inferior a unos 100 nanómetros, aún más habitualmente inferior a unos 50 nanómetros, aún más habitualmente inferior a unos 20 nanómetros, aún más habitualmente inferior a unos 10 nanómetros, e incluso aún más habitualmente inferior a unos 5 nanómetros. En otras realizaciones, al menos una de las dimensiones transversales puede ser, por lo general, inferior a unos 2 nanómetros, o inferior a aproximadamente 1 nanómetro. En un conjunto de realizaciones, la nanoestructura sensible detectora puede tener al menos una dimensión transversal que oscile entre unos 0,5 nanómetros y unos 200 nanómetros.

[0052] Las propiedades de una nanoestructura sensible detectora pueden cambiar en respuesta a la carga de su superficie, o cercana a ésta, de un modo que puede medirse mediante medición piezoeléctrica, medición electroquímica, medición electromagnética, fotodetección, medición mecánica, medición acústica, medición gravimétrica, y similares. Un ejemplo de una nanoestructura sensible detectora puede incluir, entre otras posibilidades, transistores de efecto de campo bidimensionales, cantiléveres, nanoalambres, nanotubos de carbono, y toda macroestructura, microestructura, nanoestructura, picoestructura, zeptoestructura o estructura piezoeléctrica aún más pequeña.

[0053] Determinadas realizaciones de la presente invención pueden intentar superar la limitación antes mencionada, al menos en parte, utilizando nucleótidos sintéticos que pueden comprender nucleótidos normales con una fracción informadora de masa de carga alta negativa (o positiva) unida mediante una molécula enlazadora (por ejemplo, unida al grupo 5'-fosfato), y haciendo que la longitud del enlazador aumente a medida que la reacción avanza. Puede diseñarse la masa de carga de manera que “se estire hacia abajo”, acercándose a la nanoestructura sensible (por ejemplo, un nanoalambre), de modo que ocasione un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible detectora (por ejemplo, un efecto campo u otro cambio piezoeléctrico en la estructura, en función de la nanoestructura sensible detectora que se utilice). A fin de posibilitar una medición de control de buena calidad y para asegurarse longitudes de lectura largas mediante la eliminación de la acumulación de muchas fracciones informadoras que podrían ocasionar un efecto campo que no pare de crecer, se pueden escindir dichas fracciones informadoras, al menos en ciertas realizaciones, de modo que se pueda añadir el siguiente nucleótido en la secuenciación por secuencia de síntesis.

[0054] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la reacción cíclica puede comprender al menos algunos o la totalidad de la siguiente serie entera o parcial de eventos:

1. La molécula de ssADN plantilla que se va a secuenciar puede: o ligarse a la nanoestructura sensible detectora y añadirse un cebador, o unirse a una secuencia cebadora previamente inmovilizada en la nanoestructura sensible detectora, o desenrollarse y alargarse en un canal microfluídico que esté combinado con nanoestructuras sensibles detectoras.
2. Las nanoestructuras sensibles detectoras pueden lavarse con agua o con tampón salino bajo en sal (por ejemplo, 1 x SSC).
3. Puede realizarse una medición de la nanoestructura sensible detectora.
4. Puede añadirse una mezcla que contenga un nucleótido sintético, la polimerasa y otros elementos necesarios para la reacción de polimerización. En un ejemplo, si el nucleótido añadido es complementario de la base que hay en la cadena “menos” inmediatamente después de la secuencia cebadora, puede ser incorporado por la polimerasa a la cadena en crecimiento.
5. Después, la reacción puede lavarse con agua o con tampón salino bajo en sal (por ejemplo, 1 x SSC).
6. Puede realizarse una medición de la nanoestructura sensible detectora, y con ella, observarse el efecto ocasionado por la alta masa de carga de la fracción informadora.
7. Después, puede escindirse la fracción informadora (por ejemplo, mediante una solución ácida, o enzimáticamente).
8. Los puntos 2 al 7 pueden repetirse para cada uno de los cuatro nucleótidos. Y después, esto puede repetirse las veces que sea, hasta que ya no se obtenga una señal clara.

[0055] En algunas realizaciones en las que la molécula plantilla se inmoviliza con respecto a una sonda o se une a dicha sonda que, a su vez, puede inmovilizarse respecto de la nanoestructura sensible detectora, las longitudes de los enlazadores que unen la fracción informadora de alta carga a los nucleótidos sintéticos puede aumentar a fin de hacer posible que la carga se “estire hacia abajo”, acercándose a la nanoestructura sensible detectora, de modo que ejerza un efecto. Esto puede ser necesario al menos en algunas realizaciones, a medida que el polímero de nucleótidos creciente pueda desplazar el siguiente lugar de adición de nucleótidos cada vez más lejos de la nanoestructura de detección sensible, conforme la secuenciación por reacción de síntesis va avanzando.

[0056] En algunas otras realizaciones en las que la molécula plantilla no se inmoviliza respecto de la nanoestructura sensible detectora, ni se hibrida con un cebador/sonda que, a su vez, puede inmovilizarse respecto de la nanoestructura sensible detectora, y que, en vez de ello, puede estar libre o inmovilizarse horizontalmente en un conjunto (“clúster”) de nanoestructuras sensibles detectoras, puede utilizarse una sola longitud de enlazador para cada una de las reacciones cíclicas.

Ejemplo 2 - Extensión con cebador

[0057] En algunas realizaciones, los nucleótidos sintéticos que se describen en algunos aspectos de la presente invención en cuanto a un experimento de extensión con cebador, en el que la detección se realiza con biosensores eléctricos (nanoalambres/nanotubos con efecto campo (FETs, “transistores” con efecto campo), FETs bidimensionales, nanoporos, películas/superficies piezoeléctricas, etc.). Por lo general, la extensión con cebador se define como una técnica capaz de “mapear” o determinar el extremo 5' del ADN o ARN. Por ejemplo, la extensión con cebador puede usarse para determinar el lugar de inicio de la transcripción de un gen. Por lo general, esta técnica requiere un cebador marcado, que sea complementario de una región cercana al extremo 3' del gen diana. Se deja que el cebador se anile al transcripto del gen diana, y se usa la transcriptasa inversa para sintetizar cADN complementario al transcripto, hasta que alcanza el extremo 5' de dicho transcripto. Analizando el producto en un gel de poliacrilamida, puede ser posible determinar el lugar de inicio de la transcripción, puesto que la longitud de la secuencia sobre el gel representa la distancia desde el lugar de inicio hasta el cebador marcado. Durante la síntesis de cADN, se pueden usar y añadir a la cadena de cADN naciente los nucleótidos sintéticos que se describen en esta solicitud. La adición del ácido nucleico sintético específico (por ejemplo, un desoxinucleótido con adenina, guanina, timidina o cisteína) puede ser detectada por un nanosensor. En algunas realizaciones, el nanosensor, que se describe más detalladamente más adelante, puede unirse al cebador de manera que la cadena de cADN naciente puede unirse al nanosensor. Alternativamente, en algunas otras realizaciones, puede unirse el transcripto de la secuencia diana al nanosensor (por ejemplo, nanoalambres, nanotubos, nanopérlas, nanoporos, nanohuecos, etc.).

Biosensores

[0058] Tal y como se usa en diversas realizaciones, por lo general un biosensor es un dispositivo que se usa para detectar un analito, y dicho biosensor combina un componente biológico con un componente detector fisicoquímico. En algunas realizaciones, puede comprender tres partes: 1. el elemento biológico sensible (material biológico (por ejemplo, tejido, microorganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.), un material derivado de material biológico, o un elemento biomimético). Los elementos sensibles pueden crearse mediante ingeniería biológica; 2. el transductor o elemento detector (que funciona de manera fisicoquímica: óptica, piezoeléctrica, electroquímica, etc.), que transforma la señal resultante de la interacción del analito con el elemento biológico en otra señal (tal como hacen los transductores) que puede medirse y cuantificarse con mayor facilidad; 3. elementos electrónicos o procesadores de la señal, que son responsables, principalmente, de mostrar los resultados de manera fácil de entender y usar. En algunos otros ejemplos, la unidad de procesamiento de la señal puede comprender, además, uno o más de cada uno de los siguientes elementos: unidad sensora de señal, unidad registradora de señal, unidad procesadora de datos, unidad informadora de datos.

Nanoestructuras

[0059] Tal y como se usa en diversas realizaciones, un nanoalambre es un semiconductor alargado a nanoescala que, en cualquier punto a lo largo de su longitud, tiene al menos una dimensión transversal y, en algunas realizaciones, dos dimensiones transversales ortogonales, inferiores a 500 nanómetros, preferiblemente inferiores a 200 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 150 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 100 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 70 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 50 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 20 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 10 nanómetros, e incluso inferiores a 5 nanómetros. En otras realizaciones, la dimensión transversal puede ser inferior a 2 nanómetros o a 1 nanómetro. En un conjunto de realizaciones, el nanoalambre tiene al menos una dimensión transversal que oscila entre 0,5 nanómetros y 200 nanómetros. En los casos en los que se describe que los nanoalambres tienen un núcleo y una región externa, las dimensiones que se acaban de mencionar se refieren a las del núcleo. La sección transversal del semiconductor alargado puede tener una forma arbitraria como, por ejemplo, circular, cuadrangular, rectangular, elíptica o tubular. Puede tener forma regular o irregular. Más adelante, se proporciona una lista, no limitadora, de ejemplos de materiales de los que pueden estar hechos los nanoalambres de la invención.

5 **[0060]** Los nanotubos son una clase de nanoalambres que pueden resultar útiles en la invención y, en una realización, los dispositivos de la invención incluyen alambres a una escala proporcional a los nanotubos. Tal y como se usa en la presente invención, un "nanotubo" es un nanoalambre que tiene un núcleo hueco, e incluye los nanotubos conocidos por los expertos en la materia. Un "nanoalambre no-nanotubo" es cualquier nanoalambre que no sea un nanotubo. En un conjunto de realizaciones de la invención, un nanoalambre no-nanotubo que tiene una superficie no modificada (no incluida una entidad de reacción auxiliar no inherente en el nanotubo en el entorno en el que se coloca) se usa en cualquier disposición de la invención aquí descrita en la que se puede usar un nanoalambre o un nanotubo. Un "alambre" se refiere a cualquier material que tenga una conductividad que sea, al menos, la de un semiconductor o la de un metal. Por ejemplo, el término "eléctricamente conductor" o "conductor" o "conductor eléctrico", cuando se usa en referencia a un alambre "conductor" o a un nanoalambre, se refiere a la capacidad, de ese alambre, de hacer pasar carga a través de sí mismo. Los materiales eléctricamente conductores preferidos tienen una resistividad inferior a unos 10^{-3} , más preferiblemente inferior a unos 10^{-4} y, en el caso más preferible, inferior a unos 10^{-6} o 10^{-7} ohmios-metro.

15 **[0061]** Por lo general, un nanoporo tiene uno o más orificios en una membrana eléctricamente aislante que se puede usar como detector de una sola molécula. En algunos casos, puede ser un canal proteínico biológico en una bicapa lipídica de alta resistencia eléctrica o un poro en una membrana en estado sólido. Por lo general, el nanoporo es una estructura esférica con un tamaño de nivel nanoescala, que presenta uno o más poros. Conforme a algunos aspectos, un nanoporo está hecho de carbono o de algún material conductor.

20 **[0062]** Por lo general, una nanopera es una estructura esférica con un tamaño de nivel nanoescala. Por lo general, la forma de la nanopera es esférica, aunque también puede ser circular, cuadrada, rectangular, elíptica o tubular. Puede tener forma regular o irregular. En algunos ejemplos, la nanopera puede tener un poro en su interior.

25 **[0063]** Por lo general, el nanohueco se usa en un biosensor que comprende una separación entre dos contactos, de una magnitud nanométrica. Detecta cuándo una molécula diana, o una serie de moléculas diana, se hibridan o unen entre los dos contactos, lo que permite la transmisión de una señal eléctrica entre las moléculas.

30 **[0064]** Las nanoestructuras precedentes, a saber, nanoalambre, nanotubo, nanoporo, nanopera y nanohueco, se describen a fin de proporcionar una ilustración, comprensible al instante, de algunas realizaciones, y no se debe considerar que limiten el alcance de la presente invención. Se debe considerar que, además de los ejemplos precedentes, está incluida en el ámbito de la presente invención toda nanoestructura que tenga un tamaño de nivel nanoescala y que resulte adecuada para ser aplicada en métodos y aparatos de detección de ácidos nucleicos tales como los que se describen en la solicitud.

35 **[0065]** En general, las estrategias de detección para uso con nanoestructuras o nanosensores cuya finalidad es detectar moléculas y compuestos comprenden detectar cambios en la carga en las superficies de dichas nanoestructuras o nanosensores o cerca de sus superficies, o a través de un nanohueco o nanoporo, que ocasionen un cambio en sus propiedades que se puede medir (por ejemplo, mediante transistores de efecto campo, nanohuecos, o nanosensores piezoeléctricos) a fin de detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana (ADN, ARN, cADN, etc.).

40 **[0066]** Algunos aspectos de la invención proporcionan un nanoalambre o nanoalambres, que preferiblemente forman parte de un sistema construido y dispuesto para determinar un analito en una muestra a la que es expuesto el nanoalambre o son expuestos los nanoalambres. "Determinar", en este contexto, significa determinar la cantidad y/o la presencia del analito en la muestra. La presencia del analito puede determinarse determinando un cambio en una característica del nanoalambre; habitualmente, una característica eléctrica o una característica óptica. Por ejemplo, un analito ocasiona un cambio detectable en la conductividad eléctrica del nanoalambre, o en las propiedades ópticas. En una realización, el nanoalambre incluye, inherentemente, la capacidad de determinar el analito. Se puede dotar al nanoalambre de funcionalidad, es decir, que puede comprender fracciones funcionales de superficie, a las que el analito se une e induce un cambio, medible, en una propiedad del nanoalambre. Los eventos de unión pueden ser específicos o inespecíficos. Las fracciones funcionales pueden incluir grupos simples, seleccionados de entre los grupos que incluyen, entre otros, --OH, --CHO, --COOH, --SO₃H, --CN, --NH₂, --SH, --COSH, COOR, haluro; entidades biomoleculares, incluidas, entre otras, aminoácidos, proteínas, azúcares, ADN, anticuerpos, antígenos, enzimas; cadenas poliméricas injertadas, con longitudes de cadena inferiores al diámetro del núcleo del nanoalambre, seleccionadas de un grupo de polímeros que incluye, entre otros, poliamida, poliéster, poliimida, poliacrilato; un recubrimiento fino que cubre la superficie del núcleo del nanoalambre, incluidos, entre otros, los siguientes grupos de materiales: metales, semiconductores y aislantes, que pueden ser un elemento metálico, un óxido, un sulfuro, un nitruro, un seleniuro, un polímero y un gel polimérico. En otra realización, la invención proporciona un nanoalambre y una entidad de reacción con la que el analito interacciona, situada, respecto del nanoalambre, de modo tal que puede determinarse el analito determinando un cambio en una característica del nanoalambre.

Transistor de efecto campo (FET, por sus siglas en inglés)

65 **[0067]** En general, el efecto campo se refiere a un efecto observable experimentalmente, simbolizado por "F" (en las velocidades de reacción, etc.), de la interacción coulombica intramolecular entre el centro de interés y un unipolo o dipolo

remoto (distante), mediante acción directa a través del espacio, en vez de a través de uniones o enlaces. La magnitud del efecto campo (o "efecto directo") puede depender de la carga unipolar/del momento dipolar, de la orientación del dipolo, de la distancia más corta entre el centro de interés y el unipolo o dipolo remoto, y de la constante dieléctrica efectiva. Esto se explota en los transistores que se usan en los ordenadores y, más recientemente, en los transistores de efecto campo para ADN, usados como nanosensores.

[0068] Por lo general, un transistor de efecto campo (FET) es un transistor de efecto campo que puede hacer uso del efecto campo en virtud de cambios parciales realizados en las biomoléculas para que funcionen como biosensores. La estructura de los FETs puede ser similar a la de los transistores de efecto campo con semiconductor de óxido metálico (MOSFETs), con la excepción de la estructura de la compuerta que, en los FETs con biosensor, puede ser sustituida por una capa de moléculas sonda inmovilizadas que actúan de receptores de superficie. Cuando las biomoléculas diana se hibridan con o unen a dichos receptores, la distribución de la carga cerca de la superficie cambia, lo que a su vez modula el transporte de corriente (intensidad) a través del transductor semiconductor (por ejemplo, un nanoalambre).

15 Muestras biológicas

[0069] Por lo general, el término muestra, o muestra biológica, se refiere a cualquier célula, tejido o líquido procedente de una fuente biológica (una "muestra biológica"), o de cualquier otro medio, biológico o no biológico, que pueda ser evaluado de conformidad con la invención; por ejemplo, suero o agua. Una muestra incluye, entre otras posibilidades, una muestra biológica extraída de un organismo (por ejemplo, un ser humano, un mamífero no humano, un invertebrado, una planta, un hongo, un alga, una bacteria, un virus, etc.), una muestra extraída de alimentos destinados a consumo humano, una muestra extraída de alimentos destinados a consumo animal, como pienso para ganado, leche, una muestra de una donación de órgano, una muestra de sangre destinada a usarse como fuente de sangre, una muestra tomada de un suministro de agua, y similares. Un ejemplo de una muestra es una muestra extraída de un ser humano o de un animal con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos concreta.

Ácido nucleico u oligonucleótido

[0070] Los términos ácido nucleico u oligonucleótido, o los equivalentes gramaticales que se usan en la presente invención, se refieren a al menos dos nucleótidos unidos por enlaces covalentes. Un ácido nucleico de la presente invención es, preferiblemente, de cadena simple o de cadena doble y, por lo general, contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se describe más adelante, el concepto incluye también a los análogos de ácidos nucleicos, que pueden tener esqueletos alternativos que comprendan, por ejemplo, fosforamida (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925 y las referencias allí incluidas; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; y Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), fosfotioato (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y patente estadounidense nº 5644048), fosfoditioato (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), uniones O-metilfosfoamidito (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), así como esqueletos y uniones péptido-ácido nucleico (véase Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen esqueletos positivos (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097); esqueletos no iónicos (patentes estadounidenses Nº 5386023, 5637684, 5602240, 5216141 y 4469863; *Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmacker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y esqueletos no ribósicos, incluidos los descritos en las patentes estadounidenses Nº 5235033 y 5034506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. Dentro de la definición de "ácidos nucleicos" están también incluidos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (véase Jenkins *et al.* (1995), *Chem. Soc. Rev.* páginas 169-176). En Rawls, C & E News, 2 de junio de 1997, página 35, se describen varios análogos de ácidos nucleicos. Estas modificaciones al esqueleto de ribosas-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcadores, o con la finalidad de aumentar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

55 Estrategias de detección

[0071] En un aspecto de la invención, un material biológico configurado para unirse a una nanoestructura es un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser ADN, ARN y derivados del ADN y del ARN. En una realización, el material biológico es ADN. Cuando se une ADN a la nanoestructura, el número de nucleótidos puede oscilar entre 5 bases y 100 bases. En algunas realizaciones, el número de nucleótidos del ADN puede ser 7 bases, 10 bases, 15 bases, 20 bases, 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40 bases, 45 bases, 50 bases, 60 bases, 70 bases, 80 bases, 90 bases y 100 bases. En algunas otras realizaciones, pueden unirse a la nanoestructura ácidos ribonucleicos y derivados de ácidos nucleicos. Y en algunas otras realizaciones, se pueden usar simultáneamente ADN, ARN y derivados del ADN y del ARN. Por lo tanto, en un ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de ADN,

5 mientras que, en otro ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de ARN, y en otro ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura derivados de ácidos nucleicos tales como un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido, un treosa-nucleótido, cualesquiera nucleótidos sintéticos, cualquier isoforma de los mismos y cualquier derivado de los mismos. En algunos otros ejemplos, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de nucleótidos que comprendan ADN y ARN, ADN y derivados de ácidos nucleicos, ARN y derivados, y ADN, ARN y derivados.

10 **[0072]** En otro aspecto de la invención, una nanoestructura es conductora y es capaz de detectar la carga eléctrica, que se origina a partir del nucleótido sintético tal y como se describe en esta solicitud, en su superficie, en sus cercanías, en sus tubos internos y/o en los poros que tiene dentro. Uno de los aspectos más importantes de cualquier dispositivo diagnóstico es su capacidad para realizar una detección exacta de las biomoléculas, estando su eficacia determinada por lo bien que detecta de manera específica (es decir, un porcentaje bajo de falsos positivos) y sensible (es decir, un porcentaje bajo de falsos negativos). Los nanosensores que pueden detectar cambios en la carga en sus superficies o cerca de éstas, o dentro de un nanohueco o nanoporo, que ocasionan un cambio en sus propiedades que se puede medir gracias, al menos en parte, a la unión de la molécula diana a una sonda inmovilizada en o cerca de las nanoestructuras, proporcionan un método de detección ultra-sensible, con o sin el uso limitado de marcadores (que son compuestos químicos costosos que se pueden unir a la biomolécula o molécula de interés para hacer posible que los dispositivos detectores la “detecten”).

20 **[0073]** En general, la presente descripción se refiere a protocolos de biología molecular y a estrategias de detección para uso con nanosensores que pueden detectar moléculas y compuestos mediante la detección de cambios en la carga en las superficies de dichos nanosensores o cerca de sus superficies, o a través de un nanohueco o nanoporo, cambios que ocasionan un cambio en sus propiedades que se puede medir (por ejemplo, mediante transistores de efecto campo, nanohuecos, o nanosensores o nanoestructuras piezoeléctricos), a fin de detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana (ADN, ARN, cADN, etc.). Para que estos biosensores puedan llevar a cabo su función básica, puede ser necesario que una sonda que sea un polímero de nucleótidos (o un polímero de nucleótidos sintéticos, tales como APN, morfolinos, etc) sea inmovilizada en las nanoestructuras o cerca de ellas, y que la acumulación de moléculas diana que se unen a la sonda pueda ocasionar un aumento en la densidad de carga en la superficie de las nanoestructuras o nanosensores, o cerca de dicha superficie, a causa de la carga de la sonda. Por ejemplo, un fragmento amplificado por PCR, que se une a una sonda (con una secuencia complementaria inversa a la del polímero de nucleótidos diana), inmovilizado en un nanoalambre, puede ocasionar un cambio medible en la conductancia (ΔG), a causa del aumento de carga negativa en la superficie del nanoalambre o cerca de dicha superficie, debido a un fenómeno denominado “efecto campo”. En algunas realizaciones, la carga eléctrica presente en el nucleótido sintético, que tiene su origen en el propio nucleótido y en la fracción informadora de alta masa de carga, puede ser detectada por las nanoestructuras/los nanosensores.

35 **[0074]** Dichos nanosensores pueden brindar la posibilidad de detectar biomoléculas de manera sensible y dinámica, aunque la sensibilidad puede acarrear una serie de problemas. Por ejemplo, las fluctuaciones naturales de la carga en la superficie, dentro de la matriz de muestras, puede provocar interferencias, en parte a causa de las secuencias flanqueadoras de las moléculas de polímeros de nucleótidos diana (es decir, las secuencias sobresalientes que no se unen a las sondas). Además, si en un conjunto de nanosensores se están detectando muchas moléculas diana al mismo tiempo, sería beneficioso estandarizar el tamaño y, por ende, la masa de carga, de cada una de dichas moléculas, para posibilitar comparaciones más estrictas y el control de la calidad. Asimismo, disponer de un tamaño estándar para todas las moléculas diana permite estandarizar las condiciones de hibridación de la sonda en el diseño de los estudios con conjuntos.

Sistema biosensor

50 **[0075]** Por lo general, un biosensor es un dispositivo de análisis capaz de convertir eventos moleculares en señales eléctricas. En general, las nanoestructuras utilizadas en un biosensor se usan para detectar componentes de interés como, por ejemplo, ácidos nucleicos. Por lo general, los biosensores pueden funcionar en una fase líquida o gaseosa, lo que abre un enorme abanico de aplicaciones; por ejemplo, dispositivos integrados y aplicaciones derivadas. Por lo tanto, se pueden fabricar biosensores de manera barata y que sean portátiles y que, opcionalmente, se usen como dispositivos implantables de detección y seguimiento. Otra alternativa comprende combinar el biosensor con otro aparato de alta resolución (por ejemplo, un espectroscopio de masas) y proporcionar información adicional, como la detección de la presencia, abundancia y/o variación estructural de las biomoléculas diana.

60 **[0076]** Un aspecto de la invención comprende un elemento detector de un biosensor, que puede ser un elemento detector electrónico, y un nanoalambre capaz de detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra (por ejemplo, una muestra de líquido) que contiene el analito o que se sospecha que lo contiene. Los sensores a nanoescala de la invención se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones químicas para detectar el pH o la presencia de iones metálicos; en aplicaciones biológicas para detectar una proteína, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, etc.), un azúcar o hidrato de carbono, y/o iones metálicos; y en aplicaciones medioambientales para detectar el pH, iones metálicos u otros analitos de interés.

65

[0077] Otro aspecto de la presente invención comprende un artículo de un biosensor que comprende una región de exposición de muestras y un nanoalambre capaz de detectar la presencia o ausencia de un analito. La región de exposición de muestras puede ser cualquier región que esté muy cerca del nanoalambre; y una muestra en la región de exposición de muestras accede al menos a una porción del nanoalambre. Los siguientes son ejemplos de dichas regiones de exposición de muestras, entre otros posibles: un pocillo, un canal, un microcanal, un gel. En realizaciones preferidas, la región de exposición de muestras presenta una muestra próxima al nanoalambre, o puede dirigir a una muestra hacia el nanoalambre para la determinación de un analito en dicha muestra. Puede situarse el nanoalambre adyacente a la región de exposición de muestras o dentro de ésta. Otra posibilidad es que el nanoalambre sea una sonda que se inserte en un líquido o en la trayectoria de flujo de un líquido. Además, la sonda nanoalámbrica puede comprender una microaguja y la región de exposición de muestras puede ser accesible por una muestra biológica. En tal disposición, un dispositivo que se construye y dispone para la inserción de una sonda con microaguja en una muestra biológica incluirá una región que circunde a la microaguja y que define la región de exposición de muestras, y una muestra en la región de exposición de muestras es accesible por el nanoalambre y viceversa. Se pueden crear canales de flujo de líquidos a un tamaño y una escala que sean beneficiosos para el uso en la invención (microcanales), mediante diversas técnicas, como las que se describen en la patente internacional n° WO 97/33737, publicada el 18 de septiembre de 1997.

[0078] En otro aspecto de la invención, un artículo puede comprender varios nanoalambres capaces de detectar la presencia o ausencia de una pluralidad de uno o más analitos. Cada uno de esos nanoalambres puede modificarse diferencialmente, como se ha descrito anteriormente, con lo que la sensibilidad de cada nanoalambre en relación al analito varía. En otra posibilidad, se puede seleccionar cada uno de los nanoalambres con arreglo a su capacidad de interaccionar con analitos concretos, con lo que se posibilita la detección de una diversidad de analitos. La pluralidad de nanoalambres puede orientarse al azar o paralelos entre sí. En otra posibilidad, la pluralidad de nanoalambres puede orientarse en forma de un conjunto sobre un sustrato.

[0079] Si hay un detector presente, se puede usar cualquier detector capaz de determinar una propiedad asociada al nanoalambre. Dicha propiedad puede ser electrónica, óptica, o similares. Una propiedad electrónica del nanoalambre puede ser, por ejemplo, su conductividad, resistividad, etc. Una propiedad óptica asociada al nanoalambre puede ser, por ejemplo, la intensidad de sus emisiones, o la longitud de onda de sus emisiones, si el nanoalambre es un nanoalambre emisor en el que la emisión se produce a nivel de la unión p-n. Por ejemplo, puede construirse un detector para medir un cambio en una propiedad electrónica o magnética (por ejemplo, voltaje, intensidad, conductividad, resistencia, impedancia, inductancia, carga, etc.). El detector suele incluir una fuente de alimentación y un voltímetro o un amperímetro. En una realización, puede detectarse una conductancia inferior a 1 nS. En una realización preferida, puede detectarse una conductancia del orden de milésimas de 1 nS. La concentración de una sustancia o analito, puede detectarse desde concentraciones inferiores a 1 micromol hasta concentraciones molares y superiores. Usando nanoalambres con detectores conocidos, la sensibilidad puede aplicarse a una sola molécula. En una realización, un artículo de la invención es capaz de suministrar un estímulo al nanoalambre y el detector está construido y organizado/dispuesto para determinar una señal resultante del estímulo. Por ejemplo, a un nanoalambre que incluye una unión p-n se le puede suministrar un estímulo (corriente electrónica), y el detector está construido y dispuesto/organizado de manera que puede determinar una señal (radiación electromagnética) resultante del estímulo. En una disposición así, la interacción de un analito con el nanoalambre, o con una entidad de reacción situada cerca del nanoalambre, puede afectar a la señal de una manera detectable. En otro ejemplo, en el que la entidad de reacción es un punto cuántico, dicho punto cuántico puede estar construido de manera que recibe radiación electromagnética de una longitud de onda y emite radiación electromagnética de una longitud de onda diferente. Si el estímulo es radiación electromagnética, puede verse afectada por la interacción con un analito, y el detector puede detectar un cambio en la señal resultante. Son ejemplos de estímulos: una intensidad/voltaje constante, un voltaje alterno, y una radiación electromagnética como, por ejemplo, luz.

[0080] Otro aspecto de la presente invención proporciona un artículo que comprende un nanoalambre y un detector construido y dispuesto para determinar un cambio en una propiedad eléctrica de dicho nanoalambre. Al menos una porción del nanoalambre es accesible por una muestra que contiene un analito o que se sospecha que lo contiene. La frase "accesible por un líquido" se define como la capacidad del líquido de ser situado, en relación al nanoalambre, de manera tal que un analito que se sospecha que está dentro del líquido es capaz de interaccionar con el nanoalambre. El líquido puede estar próximo al nanoalambre o en contacto con él.

[0081] En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden ensamblarse de manera que formen una pluralidad de conjuntos paralelos como, por ejemplo, microcolumnas, a densidades más altas, y en un formato compatible con los sistemas microfluídicos disponibles actualmente. Opcionalmente, los conjuntos de nanoestructuras comprenden una pluralidad de nanoestructuras tales como nanoalambres, nanotubos, nanoporos, nanopérlas, nanohuecos, o una combinación de los mismos. Cada nanoestructura del conjunto puede conectarse eléctricamente, por ejemplo mediante dos o más electrodos, a una pila, para la aplicación de un voltaje a través del nanoalambre y de un detector, de cara a la detección de cualquier cambio que aparezca en la conductancia del nanoalambre. En otra posibilidad, cada nanoestructura recibe electricidad por separado, o puede que solo una porción de las nanoestructuras del conjunto esté conectada eléctricamente.

[0082] Opcionalmente, se usa un solo detector o una combinación de detectores para detectar la señal procedente del conjunto de nanoalambres. Por ejemplo, cada nanoalambre unido a una sonda que comprende diferentes secuencias diana, que pueden estar unidas a una misma sonda o a una sonda diferente, y que se detectan, opcionalmente, por separado, de modo que puede usarse una disposición espacial de una pluralidad de nanoalambres para identificar con rapidez, por ejemplo, una pluralidad de diferentes secuencias de nucleótidos presentes en una muestra biológica (por ejemplo, sangre). En algunos ejemplos, se prepara en el conjunto una pluralidad de conglomerados de nanoestructuras, y cada conglomerado presenta diferentes sondas a fin de detectar varias secuencias diana en una muestra biológica. Como otra posibilidad, en algunos otros ejemplos, la totalidad de las nanoestructuras presentes en el conjunto puede presentar las mismas sondas, por lo que únicamente se probaría una secuencia diana, en cuanto a su presencia, abundancia y/o variaciones en la secuencia.

[0083] Por lo general, la detección que realiza la nanoestructura o el nanosensor es de un cambio en la conductancia de la nanoestructura o de su entorno. La señal puede expresarse en términos de un cambio en el voltaje que atraviesa la nanoestructura, o en la intensidad que pasa a través de la nanoestructura. Tales cambios suelen detectarse eléctricamente; por ejemplo, con un voltímetro y/o un amperímetro. En otra posibilidad, la señal es detectada digitalmente. En una realización, se aplica un voltaje a través de una nanoestructura (por ejemplo, un nanoalambre), proporcionando una señal de estado estacionario. Cuando acaece un evento de unión en la sonda unida a la nanoestructura, el campo eléctrico cercano a la nanoestructura cambia, y la conductancia de la nanoestructura cambia, lo que produce una fluctuación o cambio en la señal de estado estacionario. La señal puede ser detectada, eléctrica o digitalmente, y proporciona detección, en tiempo real, del evento de interés.

[0084] El biosensor puede integrarse asimismo en un sistema para la detección de la presencia, del nivel y/o la variación de biomoléculas. En un aspecto, un sistema así puede incluir una fuente de alimentación eléctrica y un sistema de seguimiento/vigilancia para aplicar y medir la intensidad eléctrica que atraviesa el elemento nanoestructural. En otro aspecto, un sistema así puede incluir, además, capacidades de procesamiento de datos, que posibiliten el funcionamiento programado de las nanoestructuras, y que hagan posible recibir y guardar los datos que se obtengan, así como proporcionar análisis y visualizaciones útiles de los mismos. Además, si se desea, se puede integrar en un sistema biosensor un sistema informático para procesar los datos obtenidos, así como un procesador o procesadores adicionales. El sistema informático o los elementos adicionales presentes en un sistema biosensor pueden proporcionar software para el análisis de los datos o para el funcionamiento automático, y/o un manual o manuales de realización de procesos de detección con un biosensor. Asimismo, pueden añadirse elementos adicionales que puedan mejorar el rendimiento/la eficacia de un sistema biosensor. Un biosensor de la presente invención puede recopilar datos en tiempo real.

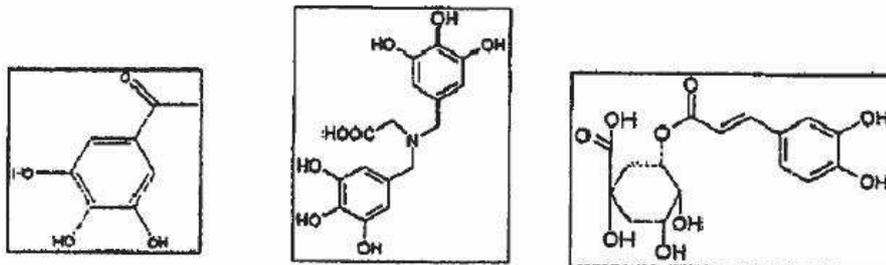
Ejemplo 3 - Hibridación; por ejemplo, con microconjuntos (*microarrays*)

[0085] En algunas otras realizaciones, el nucleótido sintético que se describe en algunos aspectos de la presente invención puede usarse en procedimientos de hibridación. Entre otros posibles ejemplos ilustrativos de los procedimientos de hibridación (ejemplos que no limitan el alcance de la invención) figura un microconjunto para ácidos nucleicos y proteínas. Asimismo, pueden incluirse como ejemplos ilustrativos otros procedimientos que precisen de hibridación y en los que puede determinarse la presencia, abundancia o variaciones estructurales de las biomoléculas diana.

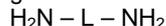
[0086] En un ejemplo, las sondas empleadas en un microconjunto pueden unirse a un medio tal como nanosensores (por ejemplo, nanoalambres, nanotubos, nanopérlas, nanoporos, nanohuecos y otras nanoestructuras). En algunos casos, las secuencias de nucleótidos diana obtenidas de las muestras biológicas se marcarían y serían puestas en contacto con las sondas. En tales casos, el nucleótido diana puede incorporar los nucleótidos sintéticos, siendo así marcado con "alta masa de carga". La unión de las secuencias diana a las sondas puede ser determinada con facilidad y rapidez por los nanosensores a los que están unidas dichas sondas. Además, el nucleótido sintético que se describe en esta solicitud puede usarse, por ejemplo, en los métodos de detección de la presencia, la abundancia y/o las variaciones estructurales de los ácidos nucleicos, tal y como se describe en la solicitud relacionada de la solicitud principal, solicitud provisional estadounidense N° 61/094017, presentada el 3 de septiembre de 2008. Como tal, el uso del nucleótido sintético que se describe en esta solicitud no está limitado y puede ampliarse más, si corresponde.

Reivindicaciones

1. Una composición informadora que es sustrato de una polimerasa, y que comprende:
 un nucleótido;
 una fracción de masa de carga alta que comprende uno o más de los siguientes grupos;



y una molécula enlazadora, en la que dicha molécula enlazadora es una molécula que tiene la siguiente fórmula general:



en la que L es de 1 a 100 grupos alquilo, grupos oxialquilo o combinaciones de los mismos, y -NH₂ puede sustituirse con cualquier grupo funcional que puede unirse, mediante enlaces cruzados, al nucleótido y a la fracción de masa de carga alta, y el enlazador se une tanto al nucleótido como a la fracción de masa de cargas alta;

en la que la molécula enlazadora o la fracción de masa de carga alta se configura de manera que no afecta a la polimerización de los nucleótidos por parte de una polimerasa ni a los enlaces de hidrógeno entre la base del nucleótido cuando se hibrida con su complemento presente en otro polímero de nucleótidos; y

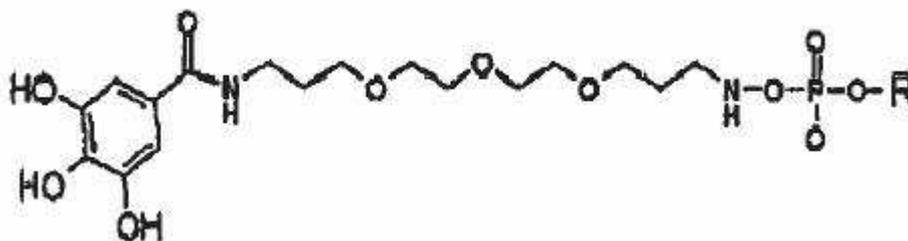
en la que la fracción de masa de carga alta comprende una masa de carga suficiente para que el acoplamiento de la composición informadora a una nanoestructura genere un cambio medible en la carga superficial asociada a dicha nanoestructura.

2. La composición informadora de la Reivindicación 1, en la que el nucleótido se selecciona de entre el grupo que comprende un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido y un treosa-nucleótido.

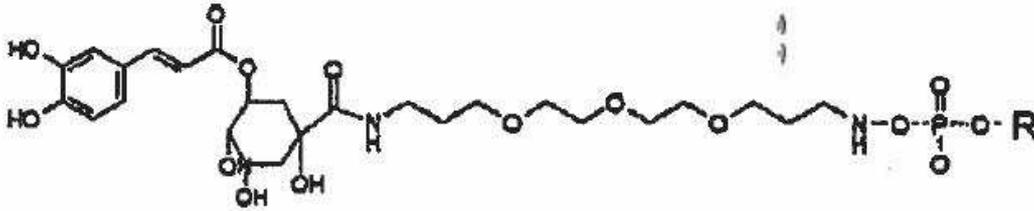
3. La composición informadora de la Reivindicación 1, en la que un número de grupos, cualesquiera derivados de los mismos y cualesquiera combinaciones de los mismos en la fracción de masa de carga alta es de 1 a 10, de 11 a 50, de 51 a 100, o superior a 100.

4. La composición informadora de la Reivindicación 1, en la que la molécula enlazadora y/o la fracción de carga alta se configuran de manera que se pueden retirar.

5. Una composición informadora de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en la que dicha composición informadora es



35 ; o



en la que R se selecciona del grupo que comprende un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido y un treosa-nucleótido.

- 5 6. Un kit con el que determinar una secuencia de nucleótidos, que comprende la composición informadora de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. Un método para sintetizar la composición informadora de cualquiera de las Reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 5, y dicho método comprende:
- 10 generar una primera unión covalente entre el nucleótido y un primer grupo amino del enlazador, y en este caso, un grupo fosfato, un azúcar o una base del nucleótido se une al primer grupo amino del enlazador; y
generar una segunda unión covalente entre un segundo grupo amino del enlazador y un grupo funcional presente en la fracción de masa de carga alta;
en el que el enlazador comprende al menos dos grupos amino.
- 15 8. El método de la Reivindicación 7, en el que el nucleótido comprende un grupo monofosfato.
9. El método de la Reivindicación 7 u 8, en el que el nucleótido se selecciona de entre el grupo que comprende adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP), citidina monofosfato (CMP), timidina monofosfato (TMP)
- 20 y uridina monofosfato (UMP).