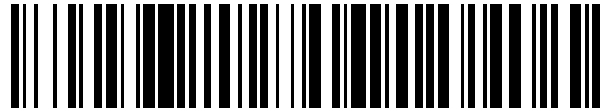


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 461**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2015 PCT/GB2015/052119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2016 WO2016012789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2015 E 15744290 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 3013987**

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

30 Prioridad:

22.07.2014 GB 201412977

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

27.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BALMFORTH, BARNABY y
FRAYLING, CAMERON ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 610 461 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 únicos

5 La presente invención se refiere a un método para detectar y caracterizar nucleótidos únicos que es especialmente adecuado para su uso en la secuenciación de ADN o ARN.

10 La secuenciación de próxima generación de material genético ya está teniendo un impacto significativo sobre las ciencias biológicas en general y la medicina en particular, dado que el coste unitario de la secuenciación está en consonancia con la llegada al mercado de máquinas de secuenciación cada vez más rápidas.

15 En las solicitudes anteriores de los inventores WO 2014/053853, WO 2014/053854, WO2014 / 167323, WO2014 / 167324 y WO2014 / 111723 se ha descrito un nuevo método de secuenciación que implica la digestión progresiva de un analito de polinucleótido a generar un flujo ordenado de nucleótidos únicos, preferiblemente una corriente de desoxirribonucleósidos trifosfato únicos, cada uno de los cuales puede ser capturado uno por uno en gotitas correspondientes en una corriente de microgotas. Después, cada gota puede manipularse química y / o enzimáticamente para revelar el nucleótido único particular que contenía originalmente. En una realización, estas manipulaciones químicas y / o enzimáticas comprenden un método que implica el uso de uno o más tipos de sondas oligonucleotídicas de dos componentes, cada uno de los cuales está adaptado para que pueda capturar de forma selectiva uno de los tipos de nucleótido único con los que está constituido el analito. Típicamente, en cada uno de tales tipos de sondas, una de las dos componentes oligonucleotídicas comprende fluoróforos característicos y, en el estado no utilizado de la sonda, la capacidad de estos fluoróforos para emitir fluorescencia permanece extinguida en virtud de la presencia de inactivadores localizados cerca mediante autoinactivación. En uso, cuando la sonda ha capturado su correspondiente nucleótido único, se hace susceptible a exonucleólisis posterior, liberando de ese modo los fluoróforos de los inactivadores y/o permitiendo que cada uno emita fluorescencia libremente. Por este medio, el nucleótido único original presente en cada gota se puede identificar indirectamente por medios espectroscópicos.

30 Fan et al en Nature Reviews Genetics 7(8) 632-644 (2006) proporcionan una revisión general del desarrollo de métodos y plataformas que han permitido a los ensayos genómicos altamente paralelos para la determinación del genotipo, la medición del número de copias, la secuenciación y la detección de la pérdida de heterocigosidad, expresión específica de alelo y metilación. La figura 2a de esta revisión muestra esquemáticamente el uso de una sonda circularizable con extremos 3' y 5' que hibridan aguas arriba y aguas abajo de un sitio de polimorfismo de nucleótido único (SNP) en un analito, dejando de ese modo un hueco que posteriormente se llena con un nucleótido que es el complementario del SNP y se forma una sonda circular completa que después puede amplificarse después de la liberación. Sin embargo, a diferencia del método de los inventores, el nucleótido que se captura durante el proceso de llenado no se obtiene directamente desde el propio analito.

40 En el documento WO03/080861 se da a conocer un proceso en el que un analito de ácido nucleico se somete a pirofosforólisis progresiva en presencia de un marcador reactivo específico de nucleótidos que se une directamente al nucleótido a medida que se libera. No solo es esto bastante diferente del método que usaron los inventores, sino que en la práctica, la señal de fluorescencia medida cuando después se buscan los nucleótidos marcados sería, probablemente, demasiado débil como para permitir la identificación fiable por encima del ruido de fondo asociado.

45 Por último, en el documento WO94/18218 se da a conocer un método de secuenciación de ADN en el que el analito se somete a exonucleólisis progresiva para generar una corriente de difosfatos o monofosfatos de nucleótido único que se incorporan después una matriz de realce de fluorescencia antes de su detección. No solo es un enfoque completamente diferente al que describen los inventores, sino que, de nuevo, se observa que cualquier señal generada sería, probablemente, sería demasiado débil como para poder detectarse e identificarse.

50 Actualmente, los inventores han desarrollado una versión mejorada del método descrito en sus solicitudes de patente anteriores, que tiene la ventaja de que se puede hacer que cada nucleótido único de lugar a muchos fluoróforos más libre que los obtenidos previamente, lo que facilita mucho la detección de la señal de fluorescencia asociada por encima del ruido de fondo. Como consecuencia, la sensibilidad de cualquier dispositivo de secuenciación usando el método mejora en gran medida y el tiempo necesario para secuenciar con precisión moléculas de ácido nucleico grandes (por ejemplo, fragmentos de ADN humanos) se puede acortar considerablemente. Además, la instrumentación necesaria para la detección es más simple y, por lo tanto, más barata de fabricar.

60 Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de secuenciación de un ácido nucleico caracterizado por que incluye las etapas de (1) generar una corriente de nucleósido trifosfatos únicos mediante pirofosforólisis progresiva del ácido nucleico; (2) producir al menos una sonda usada de oligonucleótido sustancialmente bicatenario mediante reacción en presencia de una polimerasa y una ligasa, comprendiendo al menos uno de los nucleósido trifosfatos únicos un sistema de sonda correspondiente (a) un primer oligonucleótido monocatenario marcado con elementos detectables característicos en un estado indetectable y (b) un segundo y tercero oligonucleótidos monocatenarios capaces de hibridar con regiones complementarias en el

primer oligonucleótido; (3) digerir la sonda utilizada con una enzima que tiene actividad de exonucleolítica de doble cadena para producir los elementos detectables en un estado detectable y un cuarto de oligonucleótido monocatenario que es, al menos, en parte la secuencia complementaria del primer oligonucleótido; (4) hacer reaccionar el cuarto oligonucleótido con otro primer oligonucleótido para producir un producto oligonucleotídico sustancialmente bicatenario que corresponde a la sonda utilizada; (5) repetir las etapas (3) y (4) en un ciclo y (6) detectar los elementos detectables característicos liberados en cada repetición de la etapa (3).

La etapa (1) del método de la presente invención comprende la generación de una corriente de nucleósido trifosfatos únicos a partir de un analito de ácido nucleico mediante pirofosforólisis. El analito empleado en esta etapa es, adecuadamente, un polinucleótido bicatenario cuya longitud puede ser, en principio, ilimitada, incluyendo hasta los muchos millones de bases de nucleótidos que se encuentran en un fragmento de genoma humano. Típicamente sin embargo, el polinucleótido tendrá una longitud de, al menos, 50, preferiblemente al menos 150 pares de nucleótidos; adecuadamente, la longitud será mayor que 500, mayor que 1.000 y, en muchos casos, miles de pares de nucleótidos. El propio analito es, adecuadamente, ARN o ADN de origen natural (por ejemplo, derivado de una planta, animal, bacteria o un virus), aunque el método también se puede utilizar para secuenciar el ARN o ADN producidos de forma sintética u otros ácidos nucleicos formados total o parcialmente por bases de nucleótidos que no se encuentran habitualmente en la naturaleza; es decir, bases nucleotídicas distintas de adenina, timina, guanina, citosina y uracilo. Entre los ejemplos de tales bases de nucleótidos se incluyen 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2-O-metilcitosina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, dihidrouridina, 2-O-metilpseudouridina, 2-O-metilguanosa, inosina, N6-isopentiladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosa, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metoxiuridina, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, éster metílico de ácido uridina-5-oxiacético, ácido uridina-5-oxiacético, wibutosina, wibutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, 2-O-metil-5-metiluridina y 2-O-metiluridina. En el caso del ADN, los nucleósido trifosfatos únicos generados son trifosfatos de desoxirribonucleósidos trifosfato, mientras que en el caso de ARN son trifosfatos de ribonucleósidos.

En una realización de la invención, la etapa (1) comprende una primera subetapa de unir el analito a un sustrato. Típicamente, el sustrato comprende una superficie de microfluidos, un microperla o una membrana permeable; por ejemplo, uno hecho de vidrio o un polímero no degradable. Preferiblemente, el sustrato comprende además una superficie adaptada para recibir el analito. Hay muchas maneras en las que el analito puede fijarse a dichas superficies, cualquiera de las cuales puede, en principio, usarse en esta subetapa. Por ejemplo, un método implica la imprimación una superficie de vidrio con un silano funcionalizado, tal como un epoxisilano, un aminohidrocarbilsilano o un mercaptosilano. Los sitios reactivos generados de este modo se pueden tratar con un derivado del analito que se ha modificado para que incluya un grupo de amina terminal, succinilo o tiol.

En una realización de la etapa (1), el analito se pirofosforila para generar una corriente de nucleósido trifosfatos únicos cuyo orden corresponde al de la secuencia del analito. La pirofosforólisis puede llevarse a cabo a una temperatura en el intervalo de 20 a 90 °C en presencia de un medio de reacción que comprende una polimerasa. Preferentemente, se lleva a cabo bajo condiciones de flujo continuo de modo que los trifosfatos de desoxinucleósido único se van retirando de forma continua de la zona de reacción a medida que se liberan. Más preferiblemente, la pirofosforólisis se lleva a cabo haciendo que un medio tamponado acuoso que contiene la enzima y los otros aditivos típicos fluya de forma continua sobre la superficie a la que está unido el analito.

En una realización, la enzima usada es una que puede causar una degradación pirofosforolítica 3'-5' progresiva del analito, para producir una corriente de nucleósido trifosfatos con alta fidelidad y a una velocidad de reacción razonable. Preferiblemente, esta velocidad de degradación es tan rápida como sea posible y en una realización está en el intervalo de 1 a 50 nucleósido trifosfatos por segundo. Más información sobre la reacción de pirofosforólisis según se aplica a la degradación de los polinucleótidos se puede encontrar, por ejemplo, en J. Biol. Chem. 244 (1969) pág. 3019-3028. Adecuadamente, la degradación pirofosforolítica se lleva a cabo en presencia de un medio que comprende, además, aniones pirofosfato y cationes de magnesio; preferentemente, a concentraciones milimolares.

En la etapa (2) del método de la presente invención, al menos un nucleósido trifosfato único, preferiblemente cada nucleósido trifosfato único en la corriente, se hace reaccionar en presencia de una polimerasa y una ligasa con un sistema de sondas para generar una sonda usada sustancialmente bicatenaria. Preferiblemente, antes de llevar a cabo esta etapa, el producto de la etapa (1) que contiene los nucleósido trifosfatos únicos se trata con una pirofosfatasa para hidrolizar cualquier pirofosfato residual en anión fosfato.

La polimerasa utilizada en esta etapa se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en aquellas que no muestran esencialmente actividad exonucleasa ni endonucleasa en las condiciones de reacción. Entre los ejemplos de polimerasas que se pueden usar ventajosamente se incluyen, pero sin carácter limitante, las enzimas pol 1 procariota 1 o derivados de enzimas obtenidos a partir de bacterias tales como *Escherichia coli* (por ejemplo,

fragmento Klenow de la polimerasa), *Thermus aquaticus* (por ejemplo, *Taq Pol*), *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldovelox* y *Bacillus caldotenax*. En principio se puede usar cualquier ligasa adecuada en esta etapa.

El sistema de sonda usado en la etapa (2) está compuesto por tres componentes; (a) un primer oligonucleótido monocatenario marcado con elementos detectables característicos en un estado indetectable y (b) un segundo y tercer oligonucleótido monocatenarios sin marcar o capaces de hibridar con regiones complementarias en el primer oligonucleótido. En una realización el segundo y tercer oligonucleótidos son entidades discretas, mientras que en otra, están unidos entre sí por medio de una región enlazadora. En este último caso, en una realización, la región enlazadora une los extremos de los segundo y tercer oligonucleótidos; preferentemente, el extremo 5' del segundo y el extremo 3' del tercer oligonucleótido. La región enlazadora puede ser, en principio, cualquier grupo divalente, pero, convenientemente, es otro fragmento de oligonucleótido monocatenario o bicatenario. En una realización, la región enlazadora no puede hibridar sustancialmente con el primer oligonucleótido.

Los oligonucleótidos primero, segundo y tercero se eligen de modo que, en la etapa (2), el segundo y tercer oligonucleótidos pueden hibridar, respectivamente, con las regiones flanqueantes al lado 3' y al lado 5' en el primer oligonucleótido, que están yuxtapuestas en ambos lados de una región de captura que comprende el nucleótido único cuya base nucleotídica es complementaria a la soportada por el trifosfato de nucleósido que se va a detectar. Esto hace que el sistema de sonda de tres componentes sea altamente selectivo para dicho trifosfato de nucleósido particular. Así, por ejemplo, si el analito deriva de ADN y los oligonucleótidos primero, segundo y tercero son desoxirribonucleótidos, la región de captura será altamente selectiva para el trifosfato de desoxiadenosina si el nucleótido que lo comprende lleva una base de timina. En una realización útil de la invención, la etapa (2) se puede llevar a cabo en presencia de una pluralidad de tipos de sistemas de sonda; por ejemplo uno, dos, tres o cuatro sistemas de sonda, cada uno de los cuales comprende un primer oligonucleótido que tiene una región de captura diferente característica de las diversas bases nucleotídicas diferentes buscadas y diferentes elementos detectables unidos a la misma.

Típicamente, el primer oligonucleótido tiene una longitud de hasta 150 nucleótidos, preferiblemente entre 20 y 100 nucleótidos. En una realización, el segundo oligonucleótido es más largo que la región flanqueante complementaria del lado 3' del primer oligonucleótido en hasta 10, preferiblemente de 1 a 5 nucleótidos. En otro, hay un único apareamiento erróneo de nucleótidos entre el extremo 3' del primer oligonucleótido y el nucleótido contrario en el segundo oligonucleótido para evitar que la polimerasa capture el trifosfato de nucleósido en este punto. En todavía otra realización, el extremo 3' del tercer oligonucleótido incluye un elemento resistente a la degradación exonucleolítica para asegurar que el cuarto oligonucleótido producido en la etapa (3) no se digiere posteriormente. Esto puede lograrse, por ejemplo, por medio de la incorporación de uno o más enlaces fosforotioato, un G-cuadruplex, un nucleótido borado, un dT o ddT invertido, un espaciador C3 o un grupo fosfato en o cerca de dicho extremo en particular.

Es una característica del primer oligonucleótido que está marcado de forma múltiple con su propio tipo único de elemento o elementos detectables y que estos elementos detectables son sustancialmente indetectables cuando el sistema de sonda está en un estado sin usar. Adecuadamente, estos elementos detectables son unos adaptadas para su detección después de que ha tenido lugar un acontecimiento óptico. En una realización preferida, los elementos detectables comprenden fluoróforos y cada primer oligonucleótido no usado es, esencialmente, no fluorescente en las longitudes de onda en las que los fluoróforos están diseñados para su detección. Por tanto, aunque un fluoróforo puede presentar una fluorescencia de fondo general de bajo nivel en una amplia parte del espectro electromagnético, normalmente habrá uno o un pequeño número de longitudes de onda específicas o envolventes de longitud de onda en las que la intensidad de la fluorescencia está en un máximo. En uno o más de estos máximos en el que el fluoróforo se detecta característicamente es en que esencialmente no debe producirse fluorescencia. En el contexto de esta patente, con el término "esencialmente no fluorescente" o texto equivalente se entiende que la intensidad de la fluorescencia del número total de fluoróforos unidos al primer oligonucleótido a la longitud de onda o envolvente de longitud de onda característica relevante es menor que 25 % ; preferiblemente menor que 10 % ; más preferiblemente menor que 1 % y, lo más preferiblemente, menor que 0,1 % de la intensidad de fluorescencia correspondiente de un número de fluoróforos libres.

En principio, se puede usar cualquier método para asegurar que, en el estado no utilizado del primer oligonucleótido, los fluoróforos son esencialmente no fluorescentes. Un enfoque consiste en unir, adicionalmente, los inactivadores muy cerca de ellos. Otro se basa en la observación de que cuando múltiples fluoróforos están unidos a la primera oligonucleótido muy cerca unos de otros tienden a inactivarse entre sí lo suficientemente bien como para alcanzar el criterio descrito en el párrafo anterior sin necesidad de inactivadores. Este contexto de la presente patente, lo que constituye "muy cerca" entre fluoróforos o entre fluoróforos e inactivadores dependerá de los fluoróforos e inactivadores concretos utilizados y, posiblemente, de las características estructurales del primer oligonucleótido. En consecuencia, se pretende que este término se interprete con referencia al resultado requerido en lugar de a cualquier disposición estructural particular de los diversos elementos. Sin embargo y con el fin de servir como ejemplo únicamente, se señala que cuando los fluoróforos adyacentes o fluoróforos e inactivadores adyacentes están separados por una distancia correspondiente a la distancia de Förster característica (típicamente de menos de 5 nm), en general se logrará inactivación suficiente.

Adecuadamente, el primer oligonucleótido está marcado con al menos 1, preferiblemente hasta 20 fluoróforos. Para obtener la máxima ventaja, se prefiere que el primer oligonucleótido esté marcado con al menos 2, preferiblemente al menos 3, fluoróforos. En consecuencia, los intervalos construidos a partir de cualquier permutación de estos máximos y mínimos están contemplados específicamente en el presente documento. Si se utilizan inactivadores, se prefiere igualmente que el primer oligonucleótido esté marcado con hasta 20, preferiblemente hasta 10 y, lo más preferiblemente, hasta 5 de los mismos.

En cuanto a los fluoróforos en sí mismos, pueden, en principio, se pueden seleccionar entre cualquiera de los utilizados convencionalmente en la técnica, incluyendo, pero sin carácter limitante, restos de xanteno, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina B y similares; restos de cumarina (por ejemplo, hidroxí, metilo y aminocumarina) y restos de cianina tales como Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7. Entre los ejemplos específicos se incluyen fluoróforos derivados de los siguientes colorantes de uso habitual: colorantes Alexa, colorantes de cianina, colorantes Atto Tec y colorantes de rodamina. Entre los ejemplos también se incluyen: Atto 633 (ATTO-TEC GmbH), Rojo Texas™, Atto 740 (ATTO-TEC GmbH), Rosa Bengala, Alexa Fluor™ 750 C₅-maleimida (Invitrogen), Alexa Fluor™ 532 C₂-maleimida (Invitrogen) y Rojo Rodamina C₂-maleimida y Verde Rodamina, así como colorantes de fosforoamidita, tales como Quasar 570. Como alternativa, puede emplearse un punto cuántico o colorante del infrarrojo próximo, tal como los suministrados por LI-COR Biosciences. El fluoróforo está unido típicamente al primer oligonucleótido a través de una base nucleotídica utilizando métodos químicos conocidos en la técnica.

Entre los inactivadores adecuados se incluyen aquellos que funcionan mediante un mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Entre los ejemplos de inactivadores disponibles comercialmente que se pueden usar en asociación con los fluoróforos mencionados anteriormente se incluyen, pero sin carácter limitante, DDQ-1, Dabcyl, Eclipse, Negro Iowa FQy RQ, colorante IR QC1, BHQ-0, BHQ-1, -2 y -3 y QSY-7 y -21.

En una realización, el segundo y tercer oligonucleótidos no están marcados con elementos detectables.

La etapa (2) se efectúa convenientemente poniendo en contacto cada nucleósido trifosfato único en la corriente con uno o más sistemas de sonda, como se ha descrito anteriormente a una temperatura comprendida en el intervalo de 30 a 80 °C.

El producto de la etapa (2) del método de la invención es, como se ha mencionado anteriormente, una sonda sustancialmente bicatenaria cuyas hebras constituyentes son, respectivamente, el primer oligonucleótido y el cuarto oligonucleótido complementario que, cuando se lee en su dirección 5'-3' está compuesto por el segundo oligonucleótido, a continuación, un nucleótido derivado del nucleósido trifosfato único y, por último, el tercer oligonucleótido. Si el segundo y tercer oligonucleótidos se han unido previamente a través de una región enlazadora, será fácilmente evidente que el cuarto oligonucleótido comprenderá una cadena de bucle cerrado que es altamente resistente a la exonucleólisis.

En la etapa (3), la sonda utilizada se trata con una enzima a una temperatura en el intervalo de 30 a 100 °C. En esta etapa, la hebra de la sonda utilizada derivada del primer oligonucleótido se digiere en sus nucleótidos constituyentes (monofosfatos de desoxirribonucleósidos o monofosfatos de ribonucleótidos, según sea el caso) en el proceso de separación de los elementos detectables uno de otro y, por lo tanto, inactivándolos y, por tanto, haciendo que sean detectables. Por tanto, si los elementos detectables son fluoróforos que se han inactivado en un estado indetectable en el primer oligonucleótido, la etapa (3) liberará los fluoróforos entre sí y de cualquier inactivador, haciendo que emitan fluorescencia. A medida que se produce el proceso de digestión, por tanto, el observador ve un rápido crecimiento en la señal de fluorescencia, puesto que se genera una cascada de nucleótidos únicos. Por tanto, las características de esta fluorescencia reflejan de forma indirecta la naturaleza del nucleósido trifosfato único capturado originalmente por el sistema de sonda relevante.

Las enzimas que se pueden usar en la etapa (3) comprenden exonucleasas o polimerasas que muestran actividad exonucleolítica 3'-5'. Esta clase de enzima incluye Q5, Q5 Hot Start, Phusion, Phusion HS, Phusion II, Phusion II HS, ADnasa I (sin ARNasa), exonucleasa I o III (ej. *E.coli*), exonucleasa T, exonucleasa V (RecBCD), exonucleasa lambda, nucleasa microcócica, nucleasa de soja verde, nucleasa BAL-31, RecJ_f, exonucleasa de T5 y exonucleasa de T7.

En una forma de realización al final de la etapa (3), la mezcla de reacción se cicla entre temperaturas relativamente altas y relativamente bajas con el fin de eliminar cualquier fragmento de oligonucleótido residual sobrante del primer oligonucleótido desde el cuarto oligonucleótido y para permitir que hibriden los nuevos oligonucleótidos segundo y tercero.

En la etapa (4), se hace que el cuarto oligonucleótido ahora presente en forma monocatenaria hibride con otra primera molécula de oligonucleótido, produciendo de este modo un nuevo producto de oligonucleótido sustancialmente bicatenario que corresponde a, es decir, que tiene la misma estructura química y física que la sonda usada. A continuación, este producto se digiere en una repetición de la etapa (3), liberando de este modo los elementos más detectables en un estado detectable y regenerando de nuevo el cuarto oligonucleótido. Después, de

acuerdo con la etapa (5), se deja que las etapas (3) y (4) sigan de una manera cíclica, causando una mejora adicional de la señal desde los elementos detectables libres por ejemplo, la señal de fluorescencia; en principio, hasta que se haya consumido sustancialmente todo el primer oligonucleótido. Como consecuencia, el observador ve una mayor potenciación de la señal de fluorescencia que se ha obtenido previamente.

Después de ello, y en la etapa (6), se detectan los elementos detectables liberados en las diversas repeticiones de la etapa (3) y se determina la naturaleza de la base nucleotídica unida al nucleósido trifosfato único. Al llevar a cabo el método de la invención sistemáticamente para todos los nucleósido trifosfatos únicos en la corriente generada en la etapa (1), se pueden generar y analizar los datos característicos de la secuencia del analito del ácido nucleico original. Los métodos para hacer esto son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, la fluorescencia puede detectarse utilizando un fotodetector o un dispositivo equivalente ajustado a la o las longitudes de onda de fluorescencia características o a las envolventes de la longitud de onda de los diversos fluoróforos. Esto, a su vez, hace que el fotodetector genere una señal eléctrica característica que puede procesarse y analizarse en un ordenador usando algoritmos conocidos. En una realización, se deja que transcurra un período de tiempo entre las etapas (5) y (6) para asegurar que el número de elementos detectables en un estado detectable ha crecido a un máximo.

En una realización particularmente preferida, el método de la presente invención se lleva a cabo total o parcialmente en una corriente de microgotas, al menos algunas de las cuales contienen un solo trifosfato de nucleósido; adecuadamente una corriente ordenada. Tal método puede comenzar, por ejemplo, mediante la inserción de los nucleósido trifosfatos generados en la etapa (1) uno por uno en una corriente correspondiente de microgotas acuosas mantenido en un disolvente vehículo inmiscible, tal como un aceite de hidrocarburo o silicona para ayudar a preservar el orden. Ventajosamente, esto puede lograrse mediante la creación de las microgotas directamente aguas abajo de la zona de reacción de pirofosforólisis; por ejemplo haciendo que el medio de reacción emerja de una cabeza de microgotas de dimensiones adecuadas en una corriente de flujo del disolvente. Como alternativa, pequeñas partes alícuotas del medio de reacción de la etapa (1) se pueden regular e inyectar secuencialmente en una corriente de microgotas acuosas pre-existentes en suspensión en el disolvente. Si se adopta este último enfoque, cada microgota ya puede contener los diversos componentes del sistema o sistemas de la sonda junto con las enzimas y otros reactivos (por ejemplo, tampón) necesarios para efectuar las etapas (2) a (5). En aún otro enfoque, se puede hacer que las microgotas creadas en la realización anterior se unan posteriormente con una corriente de tales microgotas preexistentes para lograr un resultado similar. En estos métodos de microgotas, la etapa (6) implica, preferentemente, analizar cada microgota para identificar los elementos detectables liberados y, por lo tanto, la naturaleza del trifosfato de nucleósido que la contenía originalmente.

A fin de evitar el riesgo de que una microgota dada contenga más de un solo trifosfato de nucleósido, se prefiere liberar cada trifosfato de nucleósido en la etapa (1) a una velocidad tal que cada microgota llena esté separada por de 1 a 20, preferiblemente de 2 a 10 microgotas vacías. Después de ello, la corriente de microgotas llenas y vacías en el disolvente se hace fluir a lo largo de un camino de flujo, convenientemente un camino de flujo microfluidado, a una velocidad y de una manera tal que las microgotas se mantienen en un estado pequeño y no tienen oportunidad de fusionarse unas con otras. Convenientemente, las microgotas empleadas tienen un diámetro finito menor que 100 micrómetros, preferiblemente menor que 50 micrómetros, más preferiblemente menor que 20 micrómetros e incluso más preferiblemente menor que 15 micrómetros. Muy preferiblemente, la totalidad de sus diámetros están comprendidos en el intervalo de 2 a 20 micrómetros. En una realización, la velocidad de flujo de las microgotas a lo largo de todo el sistema está comprendida en el intervalo de 50 a 3.000 microgotas por segundo, preferiblemente de 100 a 2.000.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un sistema de sonda que se caracteriza por que comprende (a) un primer oligonucleótido monocatenario marcado con uno o más fluoróforos en un estado indetectable y (b) los oligonucleótidos segundo y tercero monocatenarios no marcados capaces de hibridar, respectivamente, con las regiones del lado 3' y del lado 5' complementarias en el primer oligonucleótido que se yuxtaponen a cada lado de una región de captura de nucleótido único, siendo la longitud del segundo oligonucleótido al menos un nucleótido más larga que la región flanqueante del lado 3'.

En una primera forma de realización de este aspecto de la invención, el segundo y tercer oligonucleótidos están unidos por una región enlazadora, típicamente una región de oligonucleótido monocatenario o bicatenario único. En otra realización, el nucleótido en el extremo 3' del primer oligonucleótido es un apareamiento erróneo con el nucleótido correspondiente en el segundo oligonucleótido. En otra más, el tercer oligonucleótido incluye un elemento resistente a la degradación exonucleolítica en su extremo 3'. En otra realización de la invención, los fluoróforos se encuentran en la región flanqueante 5' del primer oligonucleótido que puede incluir también inactivadores.

El método y los sistemas de sonda descritos anteriormente se pueden utilizar para aprovechar en un dispositivo de secuenciación y se ha previsto que tales dispositivos estén dentro del alcance de la invención.

La presente invención se ilustrará a continuación en sus diversos aspectos con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Preparación y uso de un sistema de sonda

Se preparó un primer oligonucleótido monocatenario 1 con la siguiente secuencia de nucleótidos:

5 5'TCGTGCCTCATCGAACATGACGAGGXXQXXGGTTTGTGGT3'

10 en la que A, C, G y T representan los nucleótidos portadores de la base nucleotídica característica relevante de AND; X representa un nucleótido desoxitimidina (T) marcado con el colorante Atto 655 usando química de unión a aminas convencional, y Q representa un nucleótido desoxitimidina marcado con un inactivador BHQ-2. Comprende además una región de captura (nucleótido A) selectiva para la captura de nucleótidos desoxitimidina trifosfato (dTTP) en una mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP).

15 También se preparó otro oligonucleótido monocatenario 2, que comprende (1) una segunda región de oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria al extremo 3' del primer oligonucleótido con un apareamiento erróneo de una sola base; (2) una tercera región de oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria al extremo 5' del primer oligonucleótido y (3) una región enlazadora monocatenaria de 76 pares de bases. Tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

20 5'PCATGTTGATGAGGCACGATAGATGTACGCTTTGACATACGCTTTGACAATACTTGAGCAGTCGGCAGA
TATAGGATGTTGCAAGCTCCGTGAGTCCCACAAACCAAAACCTCG3'

en la que P representa adicionalmente un grupo fosfato en 5'.

A continuación se preparó una mezcla de reacción que comprende el sistema de sonda. Tenía una composición que corresponde a la derivada de la siguiente formulación:

25 56 ul 5x de tampón a pH 7,5
28 ul del oligonucleótido 1, 100 nM
28 ul del oligonucleótido 2, 10 nM
2,8 ul de la mezcla de dNTP (incluyendo dTTP), 10 nM
30 0,4 U de la polimerasa Phusion II Hot Start (exonucleasa)
1,6 U de la polimerasa de fragmento largo Bst
20 U de ligasa de *E. coli*
4 U de pirofosfatasa inorgánica termoestable
35 Agua hasta 280 ul

en la que el tampón 5x estaba compuesto por la siguiente mezcla:

40 200 ul de clorhidrato de Trizma, 1M, pH 7,5
13,75 ul de MgCl₂ acuoso, 1M
2,5 ul de ditiotreitol, 1M
50 ul de tensioactivo Triton X-100 (10 %)
20 ul del dinucleótido de nicotinamida adenina, 100 uM
166,67 ul de KCl
45 Agua hasta 1 ml

A continuación se llevó a cabo la captura de los dTTP y unión del oligonucleótido 2 al oligonucleótido 1, para formar una sonda de bucle cerrado mediante incubación de la mezcla a 37 °C durante 50 minutos, después de lo cual se aumentó la temperatura a 70 °C durante otros 50 minutos. A continuación, se iluminó la mezcla de reacción con la línea de 633 nm de un láser de helio-neón y la fluorescencia característica resultante del colorante Atto 655 se detectó utilizando una cámara como el ciclo de exonucleólisis y comenzó la regeneración de la sonda usada.

55 Se controló el crecimiento de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo en presencia y ausencia del componente de dNTP de la mezcla de reacción y los resultados se mostraron gráficamente en la figura 1. A partir de esto se puede ver que el sistema de sonda captura de manera eficiente los dTTP y la naturaleza cíclica del proceso de la presente invención conduce a un rápido crecimiento de la señal de fluorescencia. Por el contrario, en un experimento comparativo en el que no había dNTP presentes, el colorante Atto 655 en el oligonucleótido 1 no mostró fluorescencia en un grado significativo.

Ejemplo 2 – Método de microfuido de gotas con el sistema de sonda

60 La Figura 2 ilustra esquemáticamente un dispositivo de secuenciación de microfluidos en el que se hacen reaccionar microgotas que contienen cada una de ellas una única base nucleotídica, con un sistema de sonda del tipo anterior como se ha descrito anteriormente.

Un medio acuoso 1 que comprende una corriente de trifosfatos de nucleótidos únicos obtenidos mediante la pirofosforólisis progresiva de un analito polinucleotídico de 100 bases nucleotídicas derivado de ADN humano se hace fluir a través de un tubo de 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 7,5) a 72 °C, que comprende *Taq Pol* y una solución que tiene una concentración de 2 milimoles por litro de cada uno de pirofosfato de sodio y cloruro de magnesio, sobre una microperla de vidrio sobre la cual se ha fijado previamente el analito por medio de un puente succinilo. El orden de los nucleótidos únicos en la corriente 1, que se encuentra aguas abajo de la microperla, corresponde a la secuencia del analito. 1 emerge de la cabeza de la gota 2 en una primera cámara 3 en la que se pone en contacto con una o más corrientes de aceite de silicona ligero inmiscible 4. Las velocidades de estas corrientes se seleccionan a fin de evitar una mezcla turbulenta y crear gotas acuosas esféricas 5 suspendidas en el aceite, cada una de las cuales tiene un diámetro de aproximadamente ocho micrómetros. Típicamente, las velocidades se ajustan de modo que entre las gotas llenas adyacentes haya otras vacías. A continuación, se hace avanzar una corriente de 5 a lo largo de un segundo tubo de naturaleza microfluida del mismo diámetro hasta una segunda cámara 6 a la que también se alimenta una segunda corriente de gotas esféricas acuosas de cinco micrómetros 7 por medio de una segunda cabeza de gota 8. Se hace que las gotas 5 y 7 se fusionen de un modo secuencial para formar gotas acuosas 5 agrandadas, de aproximadamente nueve micrómetros de diámetro. Cada una de 7 contiene pirofosfatasa para destruir cualquier anión pirofosfato residual presente en cada una de 5.

A continuación, se hace avanzar una corriente de 9 a la misma velocidad por el tubo de microfluído a una tercera cámara 10, en la que estas gotas entran en contacto con una tercera corriente de gotas esféricas acuosas 11 de cinco micrómetros 11, alimentadas también a la misma por una cabeza de gota correspondiente 12. El tiempo requerido para que cada una de 9 se desplace entre las cámaras 6 y 10 es de aproximadamente 2 minutos.

Después, se hace que las gotas 9 y 11 se fusionen en 10, para producir gotas 13 (de aproximadamente diez micrómetros de diámetro). Cada una de 11 contiene una ligasa mesófila, una polimerasa termófila que presenta actividad exonucleasa de doble cadena en 3'-5' y un sistema de sonda que comprende cuatro pares de oligonucleótidos monocatenarios similares a los descritos en el ejemplo 1. Cada primer oligonucleótido tiene una longitud de 40 nucleótidos y tiene un 20º nucleótido (medido desde el extremo 5') característico de los cuatro tipos de bases nucleotídicas del ADN (es decir, A, T, G y C). Cada primer oligonucleótido también está marcado con múltiples fluoróforos e inactivadores en estrecha proximidad entre sí de tal manera que en su estado de unidos son esencialmente no fluorescentes y cuando se liberan emiten fluorescencia a una longitud de onda característica del primer oligonucleótido del que derivan. Los cuatro segundos oligonucleótidos diferentes son cada uno nucleótidos de 115 bases de longitud, tienen diferentes secuencias de terminación en sus dos extremos que son complementarias a las regiones que flanquean a las bases en la posición 20 de los primeros oligonucleótidos y tienen una región enlazadora común de 76 pares de bases.

La corriente de las microgotas fusionadas 13 formada de este modo se somete a continuación a incubación a 37 °C durante 30 minutos, seguido de 70 °C durante 30 minutos. Al final de este tiempo 13 se transfiere al sistema de detección, 14.

El sistema de detección (no mostrado) típicamente comprende una ventana de detección en la que se apunta a cada gota con luz incidente de un láser. Después, la acción de esta luz hace que los fluoróforos liberados en cada gota emitan fluorescencia de una manera característica de la base nucleotídica única que se incorporó originalmente en la molécula capturada (o esencialmente nada en absoluto si la gota estaba originalmente vacía). A continuación se detecta la presencia o ausencia de esta fluorescencia se detecta a las cuatro longitudes de onda características de los cuatro fluoróforos mencionados anteriormente. De este modo, a medida que se apunta a las gotas por turno se puede leer la secuencia de bases nucleotídicas en el analito polinucleotídico original.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Base4 Innovation Limited

55 <120> MÉTODO DE DETECCIÓN DE NUCLEÓTIDOS ÚNICOS

<130> P61091WO

<150> GB1412977.9

<151> 2014-07-22

60 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1
<211> 40

ES 2 610 461 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Oligonucleótido 1

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> nucleótido desoxitimidina (T) marcado con el colorante Atto 655

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> nucleótido desoxitimidina (T) marcado con el colorante Atto 655

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> nucleótido desoxitimidina marcado con un inactivador BHQ-2

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> nucleótido desoxitimidina (T) marcado con el colorante Atto 655

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> nucleótido desoxitimidina (T) marcado con el colorante Atto 655

<400> 1

35
 tcgtgcctca tcgaacatga cgagggtttt ggtttgtggt 40

40
 <210> 2
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido 2

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo fosfato en 5' unido a citosina

<400> 2

catgttcgat gaggcacgat agatgtacgc tttgacatac gctttgacaa tacttgagca 60
 gtcggcagat ataggatggt gcaagctccg tgagtccac aaaccaaaaa cctcgc 115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de secuenciación de un ácido nucleico caracterizado por que incluye las etapas de (1) generar una corriente de nucleósido trifosfatos únicos mediante pirofosforólisis progresiva del ácido nucleico; (2) producir al menos una sonda usada de oligonucleótido sustancialmente bicatenario mediante reacción en presencia de una polimerasa y una ligasa, comprendiendo al menos uno de los nucleósido trifosfatos únicos un sistema de sonda correspondiente (a) un primer oligonucleótido monocatenario marcado con elementos detectables característicos en un estado indetectable y (b) un segundo y tercer oligonucleótidos monocatenarios capaces de hibridar con regiones complementarias en el primer oligonucleótido; (3) digerir la sonda utilizada con una enzima que tiene actividad exonucleolítica de doble cadena para producir los elementos detectables en un estado detectable y un cuarto oligonucleótido monocatenario que es, al menos en parte, la secuencia complementaria del primer oligonucleótido; (4) hacer reaccionar el cuarto oligonucleótido con otro primer oligonucleótido para producir un producto oligonucleotídico sustancialmente bicatenario que corresponde a la sonda utilizada; (5) repetir las etapas (3) y (4) en un ciclo y (6) detectar los elementos detectables característicos liberados en cada repetición de la etapa (3).
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el extremo 5' del segundo oligonucleótido y el extremo 3' del tercer oligonucleótido están conectados por una región enlazadora.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 caracterizado por que la región enlazadora comprende una región oligonucleotídica.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizado por que el cuarto oligonucleótido generado comprende un bucle cerrado.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el primer oligonucleótido incluye una región de captura de nucleótido único que es complementaria al nucleósido trifosfato único que se va a capturar y por que la región de captura está flanqueada por regiones que son complementarias al segundo y tercer oligonucleótidos.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que los elementos detectables están situados en el primer oligonucleótido entre su extremo 5' y la región de captura.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el segundo oligonucleótido (a) hibrida con la región flanqueante en el lado 3' de la región de captura y (b) es más largo que la región en dicho lado.
- 40 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el extremo 3' del tercer oligonucleótido incluye un elemento resistente a la degradación exonucleolítica.
- 45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que hay al menos un apareamiento erróneo de bases nucleotídicas entre el extremo 3' del primer oligonucleótido y la región correspondiente del segundo oligonucleótido.
- 50 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que los elementos detectables unidos al primer oligonucleótido comprenden fluoróforos.
- 55 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que los fluoróforos se hacen indetectables en el primer oligonucleótido por la presencia de al menos un inactivador.
- 60 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el ciclado de temperatura de la etapa (3) para eliminar cualquier fragmento de oligonucleótidos residuales unidos a los cuartos oligonucleótidos después de que los elementos detectables se han liberado y para permitir que hibriden los nuevos segundo y tercer oligonucleótidos.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el sistema de sonda comprende una pluralidad de tipos de primer oligonucleótido, provisto cada uno de una región de captura diferente y elementos detectables característicos.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que se emplean hasta cuatro conjuntos diferentes de sistemas de sonda oligonucleotídica, teniendo el primer oligonucleótido de cada conjunto una región de captura selectiva de una de las bases nucleotídicas características de ADN o ARN de origen natural y elementos detectables diferentes.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa (1) comprende además contener cada nucleósido trifosfato único en una microgota correspondiente y que las etapas (2) a (6) se llevan a cabo en cada microgota.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que los resultados obtenidos mediante la aplicación de la etapa (6) a cada microgota se ensamblan en una corriente de datos de característicos de la secuencia del ácido nucleico.
- 5 17. Un sistema de sonda biológica de múltiples componentes, caracterizado por que comprende (a) un primer oligonucleótido monocatenario marcado con uno o más fluoróforos en un estado indetectable y (b) segundo y tercer oligonucleótidos monocatenarios sin marcar capaces de hibridar, respectivamente, con las regiones flanqueantes complementarias del lado 3' y del lado 5' en el primer oligonucleótido, que se yuxtaponen a cada lado de una región de captura de nucleótido único.
- 10 18. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que el extremo 5' del segundo oligonucleótido y el extremo 3' del tercer oligonucleótido están conectados por una región enlazadora.
- 15 19. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado por que la región enlazadora comprende una región oligonucleotídica.
- 20 20. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado por que los fluoróforos se localizan en la región flanqueante del lado 5' del primer oligonucleótido.
- 25 21. Un sistema de sonda biológica, de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 20, caracterizado por que el primer oligonucleótido también incluye uno o más inactivadores.
- 30 22. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 21, caracterizado por que el segundo oligonucleótido es más largo que la región flanqueante del lado 3' del primer oligonucleótido.
- 35 23. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 22, caracterizado por que el tercer oligonucleótido incluye un elemento resistente a la degradación exonucleolítica en su extremo 3'.
24. Un sistema de sonda biológica, de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23, caracterizado por que el nucleótido en el extremo 3' del primer oligonucleótido es un apareamiento erróneo con el nucleótido correspondiente en el segundo oligonucleótido.
25. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 24, caracterizado por que comprende de uno a cuatro tipos diferentes del primer oligonucleótido que difieren en la base nucleotídica característica de la región de captura y los fluoróforos usados.
26. Un sistema de sonda biológica de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 25, caracterizado por que está contenido en una microgota.

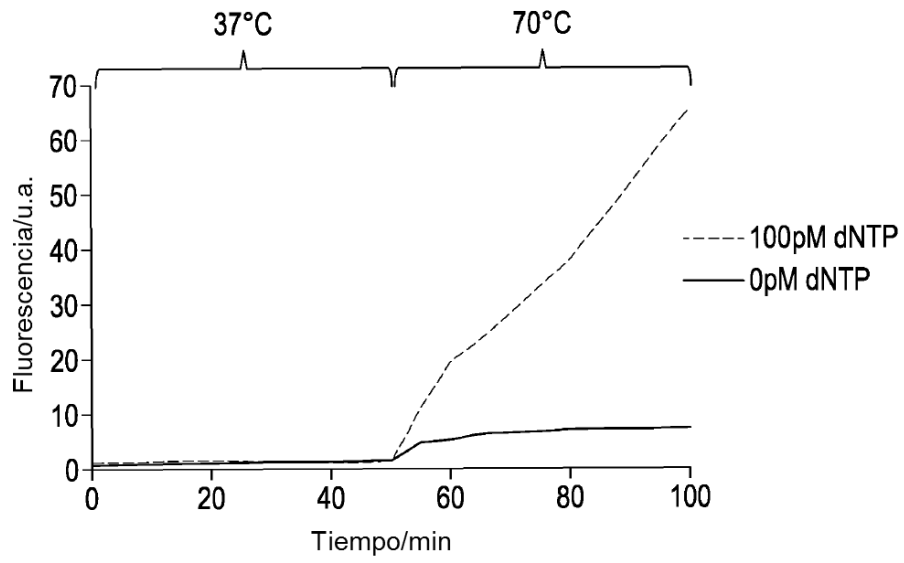


Fig. 1

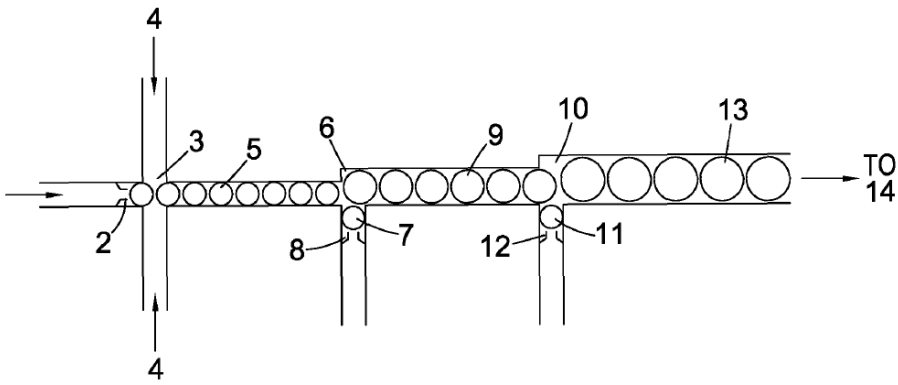


Fig. 2