

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 204**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2014 PCT/US2014/042019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15023351**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2014 E 14836664 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3008466**

54 Título: **Método para determinar longitudes de fragmentos de cadenas moleculares usando múltiples colorantes**

30 Prioridad:

11.06.2013 US 201361833823 P

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**COASTAL GENOMICS INC. (100.0%)
Ste. 182, 4664 Lougheed Hwy.
Burnaby, British Columbia V5C 5T5, CA**

72 Inventor/es:

**SLOBODAN, JARED y
NESBITT, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 754 204 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 para determinar longitudes de fragmentos de cadenas moleculares usando múltiples colorantes

Antecedentes

5 La separación electroforética de hebras de ácido nucleico (ADN/ARN) basándose en la longitud de los fragmentos (por medio de un gel o capilar) es una herramienta ampliamente usada en genética de laboratorio. Este procedimiento se usa para determinar la distribución de las longitudes de los fragmentos en una muestra de ADN/ARN. La visualización de ADN/ARN después de la separación electroforética confía en la ligazón de una o más moléculas de colorante al ADN/ARN. Una molécula de colorante se puede excitar hasta fluorescencia a fin de comprobar la localización de ADN/ARN dentro de una columna de gel, un canal u otro carril (llamados posteriormente de forma colectiva "carril" a menos que se presente otra cosa) a lo largo del cual el ADN/ARN ha cruzado a través de electroforesis. La interpretación de la distribución de las longitudes de los fragmentos de ADN/ARN confía generalmente en una comparación entre al menos una referencia de dimensionamiento, y preferiblemente una pluralidad de referencias de dimensionamiento, que consiste en ADN/ARN de tamaños conocidos discretos ("marcadores"). La implantación de marcadores se puede presentar en formas variables, pero un método común para optimizar la exactitud del dimensionamiento es incluir los marcadores en el mismo carril para la electroforesis que el ADN/ARN fragmentado.

20 Un método actualmente preferido para estimar el tamaño de fragmentos de ADN/ARN usando electroforesis comprende la inclusión de marcadores conocidos dentro de una muestra de estos fragmentos antes de comenzar la electroforesis, es decir, el uso de marcadores internos. Sin embargo, como tanto la muestra de ADN/ARN como los marcadores incorporan habitualmente el mismo colorante para facilitar su visualización dentro del carril, puede ser difícil o imposible distinguir entre los dos si hay una concentración significativa de fragmentos de ADN/ARN del mismo tamaño y con la misma longitud o longitudes que el marcador o los marcadores. En estas situaciones, la fluorescencia procedente del colorante ligado a los fragmentos de la muestra de ADN/ARN a menudo enmascarará la fluorescencia del colorante del marcador o los marcadores. Esta consecuencia da como resultado una estimación exacta del tamaño de las longitudes de fragmentos de ADN/ARN en la medida en que el marcador o los marcadores internos no se pueden distinguir para proporcionar una referencia para comparación.

30 El problema de enmascarar la señal de fluorescencia del marcador interno se puede evitar en gran parte a través de la selección de marcadores internos que sean de un tamaño que permita su discriminación de la muestra. El sistema de electroforesis capilar Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), por ejemplo, utiliza un sistema de dos marcadores internos, siendo uno muy pequeño (~15 - 50 pb) y siendo el otro muy grande (~1,5 - 17 kpb) para determinar automáticamente la distribución de las longitudes de los fragmentos de ADN/ARN. Al seleccionar marcadores internos de longitudes divergentes, las posibilidades de un solapamiento significativo de longitudes de fragmentos entre el ADN/ARN de la muestra y los marcadores se minimizan estadísticamente.

40 Aunque el uso de marcadores internos de longitudes divergentes puede evitar el problema de enmascaramiento descrito anteriormente, los resultados de la estimación de la longitud de los fragmentos se mejoran cuando el marcador o los marcadores internos sean de un tamaño que se aproxime más estrechamente al de la muestra: estimaciones más precisas de las longitudes de fragmentos de ADN/ARN se pueden proporcionar al usar marcadores internos dimensionados más adecuadamente, sin embargo, hacer esto incrementa la probabilidad de un enmascaramiento indeseable de la fluorescencia.

45 Otro enfoque para estimar el tamaño de fragmentos de ADN/ARN usando electroforesis comprende el uso de marcadores externos, es decir, introducir marcadores en un carril adyacente al carril o los carriles cargados con la muestra o las muestras de ADN/ARN. Después de que se haya completado la electroforesis, se pueden hacer estimaciones de las longitudes de los fragmentos en el carril o los carriles de la muestra al compararlos con el carril del marcador externo.

50 Los tamaños de los fragmentos de los marcadores externos se pueden elegir adecuadamente para ajustarse a los intervalos de tamaño de los fragmentos de la muestra; no hay posibilidad de solapamiento o saturación de fluorescencia entre ellos. Sin embargo, la comparación no es óptima ya que las diferencias en la corriente aplicada y la composición de la matriz del carril entre el marcador o los marcadores externos y las muestras de ADN/ARN pueden confundir las aproximaciones de dimensionamiento. Adicionalmente, los contenidos de la muestra reales pueden afectar a la movilidad de los fragmentos, de modo que la velocidad de migración de moléculas idénticas puede diferir entre canales dependiendo de la composición restante de la muestra. Para explicar las diferencias y mejorar las estimaciones de las longitudes de los fragmentos, es mejor incluir los marcadores con la muestra de ADN/ARN en el mismo carril.

60 Finalmente, otro método para determinar longitudes de fragmentos implica etiquetar marcadores internos con colorantes fluorescentes con espectros de excitación/emisión únicos en los extremos de moléculas de ADN/ARN, véase, p. ej., el documento EP-A-2113574. No obstante, este método tiene limitaciones. Debido a que las moléculas

de colorante solo están ligadas a los extremos de los marcadores internos, cualquier señal emitida por esta molécula marcadora es mínima, y solo se puede detectar mediante detectores muy sensibles costosos que no son compatibles con la electroforesis en gel. Adicionalmente, los marcadores grandes (es decir, mayores de 2.500 pb) tienen relaciones excesivamente altas de fragmento de ADN/ARN/molécula de colorante. Y, debido a que la masa absoluta de los marcadores que se pueden cargar tiene un límite superior práctico, esta relación impide la utilización de marcadores internos grandes incluso para sistemas analíticos con detectores muy sensibles (es decir, sistemas capilares).

SUMARIO DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta las deficiencias precedentes asociadas con la técnica anterior, la presente invención se dirige a métodos para visualizar separadamente muestras de ADN/ARN procedentes de marcadores internos en un carril de electroforesis común, para ayudar a estimar longitudes de fragmentos de ADN/ARN dentro de la muestra. Como consecuencia, se pueden seleccionar uno o más marcadores internos, que se pueden incluir dentro de la distribución de fragmentos de muestras de ADN/ARN durante la estimación de la distribución de las longitudes de fragmentos de una muestra de ADN/ARN, para un valor comparativo máximo. Beneficiosamente, se elimina el problema histórico del enmascaramiento de las señales de fluorescencia de marcadores internos por la de los fragmentos de ADN/ARN, y sin embargo las intensidades de las señales de fluorescencia de los marcadores internos son suficientes para el uso incluso en aparatos electroforesis menos sensibles, tales como los que usan hardware de obtención de imágenes CCD o MOSFET (p. ej. tecnologías con cámaras digitales convencionales) y/o hardware de iluminación incoherente (p. ej. tecnologías de LED convencionales).

La invención comprende el uso de una pluralidad de colorantes fluorescentes para fragmentos de muestras de ADN/ARN y al menos un marcador interno en una muestra para permitir la fluorescencia simultánea en un aparato de electroforesis y dar espectros de emisión no competitivos y/o fluorescencia secuencial para dar de forma similar espectros de emisión no competitivos pero que están temporalmente separados.

Si se desea una resolución mejorada de la longitud de los fragmentos, se pueden usar múltiples marcadores internos y/o colorantes según la invención con respecto a combinaciones simples de colorante-marcador. Así, los métodos según la invención incluyen el etiquetado de cualquier marcador interno con al menos una, y preferiblemente más de una, molécula de colorante única a lo largo de la longitud del marcador interno. Esto hace compatible el enfoque de estimación del tamaño con medios detectores de bajo coste (p. ej., una cámara óptica) que se usan a menudo con la electroforesis en gel. También permite la utilización de marcadores internos grandes (p. ej., > ~2500 pb) con la metodología de colorantes múltiples avanzada en la presente.

Además de una sensibilidad y una selectividad de la longitud de los fragmentos incrementadas, la capacidad para visualizar exclusivamente un marcador interno cuando se ponen en práctica diversas realizaciones de la invención obvia la necesidad de cargar una masa absoluta de un marcador interno que de otro modo se distinguiría fehacientemente de la señal de fluorescencia del ADN/ARN de interés. Por consiguiente, generalmente es necesario menos de 10% del marcador interno original para alcanzar la elucidación deseada que de otro modo sería necesaria sin el uso de la solución de colorante según la invención. Esta reducción sobre las soluciones de un solo colorante de la técnica anterior se proyecta para ahorrar más de 50% en los costes de operación además de incrementar la exactitud de la evaluación de los fragmentos de ADN/ARN cuando se ponen en práctica las realizaciones de dos colorantes de la invención. Axiomáticamente, los técnicas ya no requieren tener un conocimiento adelantado detallado de longitudes de fragmentos sobreabundantes potenciales en la muestra de ADN/ARN que podrían enmascarar la señal procedente de marcadores internos seleccionados. Por lo tanto, los métodos de múltiples colorantes según la invención también reducirán el tiempo necesario para efectuar las determinaciones de la distribución de las longitudes de los fragmentos.

En una serie de realizaciones de la invención, un primer colorante que tiene un primer espectro de emisión cuando fluoresce mediante un primer medio de excitación, tal como un fuente luminosa de longitud de onda limitada, se asocia con al menos un marcador, y un segundo colorante que tiene un segundo espectro de emisión diferente del primer colorante cuando fluoresce mediante un segundo medio de excitación, tal como una fuente luminosa de longitud de onda limitada, diferente del primer medio de excitación, se asocia con una pluralidad de fragmentos de la muestra de ADN/ARN, en donde los fragmentos de la muestra de ADN/ARN y el al menos un marcador están dispuestos en un carril de electroforesis en gel común. Al menos una porción del carril se excita simultáneamente mediante los medios de excitación primero y segundo de modo que ambos colorantes fluorescieran simultáneamente, y/o los colorantes se hagan fluorescer secuencialmente. Como consecuencia de esta metodología, se pueden seleccionar uno o más marcadores internos con un tamaño que se puede esperar que se solape con una longitud del fragmento demasiado abundante (conocida como adaptérmero), que puede estar presente en una muestra de ADN/ARN que se está caracterizando. Este solapamiento, que permite comparaciones de alta precisión entre el marcador o los marcadores y los fragmentos de la muestra de ADN/ARN, encuentra una utilidad particular con respecto a estimaciones de la distribución de las longitudes de los fragmentos para un grupo de moléculas de ácido nucleico biológicamente importantes conocidas como miARNs.

- Un método para llevar a cabo las asociaciones de colorantes precedentes comprende unir covalentemente uno de los colorantes a múltiples centros en al menos un, y preferiblemente una pluralidad de fragmentos de la muestra de ADN/ARN, y efectuar una unión de menor intensidad entre el otro colorante y múltiples centros en al menos un, y preferiblemente una pluralidad de, fragmentos de marcador. Así, se pueden usar moléculas de colorante y compuestos que comprenden las mismas tales como Cy5, Alexa Fluor 647 y DyLight 650 para establecer en primer lugar el etiquetado de los marcadores mientras que se pueden usar moléculas de colorante y compuestos que comprenden las mismas tales como SYBR Gold, SYBR Green, bromuro de etidio y Pico Green para establecer a continuación el etiquetado de fragmentos de la muestra de ADN/ARN.
- Se debe apuntar que en el ejemplo referido anteriormente, no es necesaria la asociación separada de moléculas de colorante unidas no covalentemente. Se han obtenido resultados adecuados a partir de la exposición simultánea de los marcadores etiquetados y los fragmentos de DNR/ARN no etiquetados a la molécula de colorante unida no covalentemente. Aunque todavía puede haber centros de unión disponibles sobre los marcadores, el hecho de que los marcadores ya tengan una pluralidad de moléculas de colorante unidas covalentemente a los mismos minimiza los centros de unión disponibles, y las firmas de fluorescencia únicas entre los colorantes permiten la sustitución de posiciones apropiada durante etapas de ensayo posteriores. Por lo tanto, y como se indica generalmente, las diversas realizaciones de la invención se permiten suficientemente cuando al menos uno de los marcadores de los fragmentos de la muestra de ADN/ARN están etiquetados exclusivamente con uno de los colorantes únicos.
- En vista de los incrementos en la sensibilidad, la selectividad de la determinación de las longitudes de los fragmentos, la elección de los tamaños de los fragmentos de ADN/ARN para usar como marcadores internos, así como la disminución en los costes de operación y el tiempo, la invención que se ejemplifica en sus diversas realizaciones representa un avance significativo sobre los esfuerzos de la técnica anterior en el campo de la electroforesis en medios de tipo gel que usan marcadores internos con oportunidades de visualización asistidas por colorantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE UNA REALIZACIÓN DE LA INVENCION

En referencia generalmente a las Figs. 1A y 1B, ADN/ARN se somete a electroforesis a lo largo de un carril (véase *Carril electroforético esquemático*) haciendo que los fragmentos más pequeños atraviesen el medio a una velocidad más rápida que los fragmentos más grandes y, así, la muestra se separa por longitud de los fragmentos, como se conoce bien en la especialidad. Como tanto el ADN/ARN como los marcadores internos se desplazan conjuntamente, se pueden visualizar conjuntamente durante la electroforesis. En la Fig. 1A, *ADN de muestra bicatenario* se ha etiquetado con un primer colorante (*Molécula de Colorante N° 1*) y cuando se excita mediante un *LED Azul* emite luz verde. El *Marcador interno* se ha etiquetado con un segundo colorante (*Molécula de Colorante N° 2*) y cuando se excita con un *LED Rojo* emite luz roja. Una *Cámara* captura una *Primera imagen del carril electroforético* y pasa los datos a un paquete de software para análisis de imágenes.

En la Fig. 1B, el *LED Azul* se apaga inmediatamente para extinguir la excitación de la *Molécula de Colorante N° 1* y suprimir la emisión de la luz verde. Con el *LED Rojo* excitando todavía la *Molécula de Colorante N° 2*, el *Marcador interno* se visualiza exclusivamente. A continuación, la *Cámara* captura una *Segunda imagen del carril electroforético* y la pasa al paquete de software para análisis de imágenes. A continuación, el paquete compara las dos imágenes y, sabiendo el tamaño del *Marcador interno*, determina el tamaño de las longitudes de los fragmentos circundantes que constituyen el *ADN de Muestra*. Nótese que en otra realización de este procedimiento, la *Primera imagen del carril electroforético* se puede capturar cuando solamente el *LED Azul* está encendido para visualizar el *ADN de Muestra*. Esto asegura que la visualización del *Marcador interno* y el *ADN de Muestra* pueda ser mutuamente exclusiva.

En referencia a continuación a la Fig. 2, se muestran espectros de Excitación/Emisión representativos para dos posibles moléculas de colorante que se podrían usar en el sistema de dos colorantes. La *Molécula de Colorante N° 1* ocupa una longitud de onda de un intervalo de longitudes de onda de excitación/emisión que es suficientemente diferente del de la *Molécula de Colorante N° 2* para permitir la discriminación entre las dos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para visualizar al menos un fragmento de una muestra de ADN/ARN separadamente de al menos un marcador interno de una longitud conocida, estando ambos dispuestos en un carril electroforético de gel común, para ayuda a estimar las longitudes de los fragmentos de la muestra de ADN/ARN, comprendiendo el método:
- 5 - etiquetar el al menos un marcador interno con un primer colorante que etiqueta exclusivamente el al menos un marcador interno, teniendo el primer colorante un primer espectro de emisión cuando fluoresce mediante un primer medio de excitación; y
- 10 - etiquetar el al menos un fragmento de la muestra de ADN/ARN con un segundo colorante que tiene un segundo espectro de emisión cuando fluoresce mediante un segundo medio de excitación, siendo el segundo espectro de emisión diferente del primer espectro de emisión; caracterizado por que cada uno de los al menos un marcadores internos está etiquetado con una pluralidad de primeras moléculas de colorante, y en donde el al menos un marcador interno está etiquetado a lo largo de su longitud con el primer colorante.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el carril se excita simultáneamente mediante los medios de excitación primero y segundo.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el carril se excita secuencialmente mediante los medios de excitación primero y segundo.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer colorante se selecciona de Cy5, Alexa Fluor 647 y DyLight 650.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el segundo colorante se selecciona de SYBR Gold, SYBR Green, bromuro de etidio y Pico Green.

Fig. 2

