

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 000**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6869** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849196 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3204519**

54 Título: **Análisis de polinucleótidos basado en nanoporos con marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente**

30 Prioridad:

**10.10.2014 US 201462062256 P**

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

**23.10.2020**

73 Titular/es:

**QUANTAPORE INC. (100.0%)  
815 Dubuque Avenue  
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**HUBER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 789 000 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

Análisis de polinucleótidos basado en nanoporos con marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente

## Antecedentes

5 Las tecnologías de secuenciación de ADN desarrolladas durante la última década han revolucionado las ciencias biológicas, por ejemplo, Lerner et al., *The Auk*, 127: 4-15 (2010); Metzker, *Nature Review Genetics*, 11: 31-46 (2010); Holt et al., *Genome Research*, 18: 839-846 (2008); y tienen el potencial de revolucionar muchos aspectos de la práctica médica, por ejemplo, Voelkerding et al., *Clinical Chemistry*, 55: 641-658 (2009); Anderson et al., *Genes*, 1: 38-69 (2010); Freeman et al., *Genome Research*, 19: 1817-1824 (2009); Tucker et al., *Am. J. Human Genet.*, 85: 142-154 (2009). Sin embargo, para aprovechar ese potencial, todavía hay una serie de desafíos que deben abordarse, incluida la reducción del costo de secuenciación por procedimiento, la simplificación de la preparación de la muestra, la reducción del tiempo de proceso, el aumento de la duración de las lecturas, la mejora del análisis de datos y similares, por ejemplo, Baker, *Nature Methods*, 7: 495-498 (2010); Kircher et al., *BioEssays*, 32: 524-536 (2010); Turner et al., *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10: 263-284 (2009). La secuenciación de una sola molécula usando nanoporos puede abordar algunos de estos desafíos, por ejemplo, Maitra et al., *Electrophoresis*, 33: 3418-3428 (2012); Venkatesan et al., *Nature Nanotechnology*, 6: 615-624 (2011); sin embargo, este enfoque tiene su propio conjunto de dificultades técnicas, como la fabricación confiable de nanoporos, el control de las tasas de translocación de ADN, la discriminación de nucleótidos, la detección de señales eléctricas de grandes conjuntos de sensores de nanoporos y similares, por ejemplo, Branton et al., *Nature Biotechnology*, 26 (10): 1146-1153 (2008); Venkatesan et al., (citado anteriormente).

20 La detección óptica de nucleótidos se ha propuesto como una posible solución a algunas de las dificultades técnicas en el campo de la secuenciación de nanoporos, por ejemplo, Huber, patente de los Estados Unidos No. 8.771.491; Russell, patente de los Estados Unidos No. 6.528.258; Pittaro, publicación de patente de los Estados Unidos No. 2005/0095599; Joyce, publicación de patente de los Estados Unidos No. 2006/0019259; Chan, patente de los Estados Unidos No. 6.355.420; McNally et al., *Nano Lett.*, 10 (6): 2237-2244 (2010); los documentos WO2012/121756, WO2014/066905 y similares. Sin embargo, la secuenciación óptica de nanoporos no se ha realizado por una variedad de razones, incluida la falta de técnicas de fabricación adecuadas y la comprensión de cómo interactúan los elementos de dichos sistemas.

30 En vista de lo anterior, sería ventajoso para la tecnología de sensores de nanoporos en general y sus aplicaciones particulares, tales como la secuenciación óptica de nanoporos, si hubiera materiales disponibles y configuraciones de elementos ópticos que permitieran la detección óptica y el análisis de analitos con éxito, tales como las secuencias de ácidos nucleicos.

## Sumario de la invención

La invención proporciona un método para determinar una secuencia de nucleótidos de al menos un polinucleótido comprendiendo el método las etapas de:

35 translocar al menos un polinucleótido de cadena sencilla a través de un nanoporo, en el que los nucleótidos del polinucleótido de cadena sencilla se marcan con marcadores fluorescentes a partir de un conjunto que se inactiva mutuamente, en el que el nanoporo obliga a los marcadores fluorescentes dentro del nanoporo a un estado restringido en el que no se genera prácticamente ninguna señal detectable, y en el que cada marcador fluorescente del conjunto que se inactiva mutuamente (i) inactiva la fluorescencia de cada marcador fluorescente del conjunto de tal manera que las marcadores fluorescentes de nucleótidos adyacentes están en un estado inactivado en solución libre y (ii) genera una señal fluorescente distinta cuando se excita y cuando está en un estado no inactivado;

excitar el marcador fluorescente de cada nucleótido al salir del nanoporo y antes de la formación de un estado inactivado con un nucleótido adyacente;

45 medir una señal fluorescente generada por el marcador fluorescente que sale para identificar el nucleótido al que está unido el marcador fluorescente; y

determinar una secuencia de nucleótidos del polinucleótido a partir de una secuencia de señales fluorescentes.

La presente divulgación está dirigida a métodos, kits y sistemas para la detección óptica y el análisis de polinucleótidos, tales como polinucleótidos, en dispositivos microfluidos y/o nanofluidos; en particular, la divulgación incluye métodos y sistemas que usan nanoporos para determinar secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos.

50 En el presente documento se describe un método para determinar una secuencia de monómero de un polinucleótido que comprende las siguientes etapas: (a) translocar un polinucleótido a través de un nanoporo, en el que los monómeros del polinucleótido se marcan con marcadores fluorescentes de manera que en solución libre los marcadores fluorescentes de monómeros adyacentes inactivan sustancialmente cada una de las otras emisiones de fluorescencia (es decir, tales marcadores están en un "estado inactivado" o "configuración inactivada") y en el que el nanoporo restringe los marcadores fluorescentes dentro de su agujero a un estado restringido de tal manera que se

genera una señal fluorescente no detectable, o una señal fluorescente sustancialmente no detectable; (b) excitar el marcador fluorescente de cada monómero al salir del nanoporo y antes de la formación de una configuración inactivada con un marcador fluorescente adyacente; (c) medir una señal fluorescente generada por la salida del marcador fluorescente para identificar el monómero al que está unido el marcador fluorescente; y (d) determinar una secuencia de monómero del polinucleótido a partir de una secuencia de señales fluorescentes.

En este documento se describe un método para determinar una secuencia de nucleótidos de al menos un polinucleótido que comprende las etapas de: (a) translocar al menos un polinucleótido de cadena sencilla a través de un nanoporo, en el que los nucleótidos del polinucleótido de cadena sencilla se marcan con marcadores fluorescentes de manera que en solución libre, los marcadores fluorescentes de nucleótidos adyacentes se encuentran en un estado inactivado que inactiva las emisiones de fluorescencia de las partes del polinucleótido fuera del nanoporo (es decir, partes del polinucleótido que aún no han entrado o que ya han salido del nanoporo), y en el que el nanoporo fuerza a los marcadores fluorescentes dentro del nanoporo en un estado restringido en el que sustancialmente no se genera una señal detectable; (b) excitar el marcador fluorescente de cada nucleótido al salir del nanoporo y antes de formar un estado inactivado con un marcador fluorescente de un nucleótido adyacente; (c) medir una señal fluorescente generada por el marcador fluorescente que sale para identificar el nucleótido al que está unido el marcador fluorescente; y (d) determinar una secuencia de nucleótidos del polinucleótido a partir de una secuencia de señales fluorescentes. En algunos casos, los nucleótidos de los polinucleótidos se marcan con segundos miembros de un par de FRET, cada segundo miembro produce una señal de FRET indicativa del nucleótido al que está unido, de modo que los nucleótidos del polinucleótido pasan en secuencia por un primer miembro del par de FRET posicionado junto a la salida del nanoporo para que cada segundo miembro al salir del nanoporo pase dentro de una distancia de FRET del primer miembro del par de FRET.

En algunas realizaciones, los nanoporos se fabrican en una membrana de fase sólida de modo que los primeros miembros de un par de FRET se unen a la membrana de fase sólida adyacente a sustancialmente cada nanoporo. En otras realizaciones, los nanoporos comprenden nanoporos de proteínas dispuestos en aberturas fabricadas en una membrana de fase sólida en la que los primeros miembros de un par de FRET están unidos al nanoporo de proteína.

La presente invención se ejemplifica en una serie de implementaciones y aplicaciones, algunas de las cuales se resumen a continuación y a lo largo de la memoria descriptiva.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 A ilustra esquemáticamente un ejemplo de realización de la invención.

La Figura 1B ilustra las señales esperadas para diferentes tiempos de auto inactivación después de que un marcador fluorescente o aceptor sale de un nanoporo.

La Figura 1C ilustra las señales esperadas durante un tiempo especificado para auto inactivación y las compara con la señal registrada de un polinucleótido objetivo marcado que transloca un nanoporo.

Las Figuras 2A-2C ilustran un biosensor híbrido.

La Figura 2D ilustra un dispositivo con posicionamiento de un miembro de un par de FRET usando hibridación de oligonucleótidos.

La Figura 2E ilustra un nanoporo híbrido en el que la superficie de la membrana (201) de estado sólido recubierta con una capa (202) hidrófoba a la que se adhiere una capa (203) de lípidos. Los lípidos forman un sello de gigaohm con la proteína del poro insertada.

Las Figuras 3A-3H muestran los diagramas de reacción de diversas químicas de enlace ortogonal para unir marcadores fluorescentes a bases de polinucleótidos.

#### Descripción detallada de la invención

Se muestran tipos y números de nanoporos particulares, marcadores particulares, pares de FRET, esquemas de detección, enfoques de fabricación de la invención para propósitos de ilustración. Sin embargo, se apreciará que la divulgación no pretende ser limitante en este sentido, ya que se pueden utilizar otros tipos de nanoporos, arreglos de nanoporos y otras tecnologías de fabricación para implementar diversos aspectos de los sistemas discutidos en el presente documento. La orientación para los aspectos de la invención se encuentra en muchas referencias y tratados disponibles bien conocidos por aquellos con habilidades ordinarias en la técnica, que incluyen, por ejemplo, Cao, Nanostructures & Nanomaterials (Imperial College Press, 2004); Levinson, Principles of Lithography, Segunda edición (SPIE Press, 2005); Doering y Nishi, Editores, Handbook of Semiconductor Manufacturing Technology, Segunda edición (CRC Press, 2007); Sawyer et al., Electrochemistry for Chemists, Segunda edición (Wiley Interscience, 1995); Bard y Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, Segunda edición (Wiley, 2000); Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Tercera edición (Springer, 2006); Hermanson, Bioconjugate Techniques, Segunda edición (Academic Press, 2008); y similares.

La divuñlgación se refiere al uso de nanoporos, ionactivadores fluorescente y señalización fluorescente para identificar secuencialmente monómeros de analitos poliméricos. Tal análisis de analitos poliméricos puede llevarse a cabo en analitos poliméricos individuales o en una pluralidad de analitos poliméricos en paralelo al mismo tiempo, por ejemplo, usando una matriz de nanoporos. En algunos casos, los monómeros están marcados con marcadores fluorescentes que son capaces de al menos tres estados mientras están unidos a un polinucleótido objetivo: (i) Un estado sustancialmente inactivado en el que la fluorescencia de un marcador fluorescente unido se inactiva mediante un marcador fluorescente en un monómero inmediatamente adyacente: por ejemplo, un marcador fluorescente unido a un polinucleótido de acuerdo con la invención se inactiva sustancialmente cuando el polinucleótido marcado está libre en solución acuosa convencional para estudiar y manipular el polinucleótido, (ii) Un estado estéricamente restringido en el que un polinucleótido marcado se transloca a través de un nanoporo de tal manera que los movimientos o alineaciones de la solución libre de un marcador fluorescente unido se interrumpen o limitan de manera que haya poca o ninguna señal fluorescente detectable generada a partir del marcador fluorescente. (III) Un estado de transición en el que un marcador fluorescente unido a un polinucleótido pasa del estado restringido estéricamente al estado inactivado cuando el marcador fluorescente sale del nanoporo (durante un "intervalo de transición") mientras el polinucleótido se transloca a través del nanoporo.

En parte, la invención es una aplicación del descubrimiento de que durante el intervalo de transición un marcador fluorescente (en un polinucleótido de otro modo sustancialmente marcado y autoinactivado) es capaz de generar una señal fluorescente detectable. Sin querer estar limitado por ninguna teoría subyacente a este descubrimiento, se cree que la señal fluorescente generada durante el intervalo de transición se debe a la presencia de un dipolo de rotación libre en el marcador fluorescente que emerge del nanoporo, lo que hace que el marcador fluorescente temporalmente sea capaz de generar una señal fluorescente, por ejemplo, después de la excitación directa o a través de FRET. Tanto en el estado restringido estéricamente como en el estado inactivado, los dipolos están limitados en su libertad de rotación, lo que reduce o limita el número de fotones emitidos. En la invención, el polinucleótido es un polinucleótido de cadena sencilla, tal como ADN o ARN. La invención proporciona un método para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido mediante el registro de señales generadas por marcadores fluorescentes unidos a medida que salen de un nanoporo uno a la vez a medida que un polinucleótido se transloca a través del nanoporo. Al salir, cada marcador fluorescente unido transita durante un intervalo de transición desde un estado restringido en el nanoporo a un estado inactivado en el polinucleótido en solución libre. En otras palabras, una etapa del método de la invención comprende excitar cada marcador fluorescente a medida que está pasando de un estado restringido en el nanoporo a un estado inactivado en el polinucleótido en solución libre. Como se mencionó anteriormente, durante este intervalo o período de transición, el marcador fluorescente es capaz de emitir una señal fluorescente detectable indicativa del nucleótido al que está unido.

La invención es una aplicación del descubrimiento de que los marcadores fluorescentes y los nanoporos pueden seleccionarse de modo que durante la translocación de un polinucleótido a través de un nanoporo, los marcadores fluorescentes unidos a los monómeros sean forzados a un estado restringido en el que son incapaces (o sustancialmente incapaces) de producir una señal fluorescente detectable. En algunas realizaciones, se seleccionan nanoporos que tienen un agujero, o luz, con un diámetro en el intervalo de 1 a 4 nm; en otras realizaciones, se seleccionan nanoporos que tienen un agujero o luz con un diámetro en el intervalo de 2 a 3 nm. En algunas realizaciones, dichos diámetros de agujero son proporcionados por un nanoporo de proteína. En algunas realizaciones, dichos nanoporos se usan para forzar los marcadores fluorescentes a un estado restringido de acuerdo con la invención, de modo que siempre que un marcador fluorescente sale de un nanoporo, pasa de ser sustancialmente incapaz de generar una señal fluorescente a ser detectable e identificable por un señal fluorescente que puede ser inducida a emitir. Por lo tanto, los marcadores fluorescentes unidos a cada una de una secuencia de monómeros de un polinucleótido pueden detectarse en secuencia, ya que de repente generan una señal fluorescente en una región inmediatamente adyacente a una salida de nanoporos (una "zona de transición" o "volumen de transición"). En algunas realizaciones, los colorantes fluorescentes orgánicos se usan como marcadores fluorescentes con nanoporos de los diámetros anteriores. En algunas realizaciones, al menos uno de dichos colorantes fluorescentes orgánicos se selecciona del conjunto que consiste en colorantes de xanteno, colorantes de rodamina y colorantes de cianina. En algunos casos para determinar la secuencia de monómero de un polinucleótido se puede llevar a cabo con las siguientes etapas: (a) translocar un polinucleótido a través de un nanoporo, en el que los monómeros del polinucleótido se marcan con marcadores fluorescentes en los que el nanoporo restringe los marcadores fluorescentes dentro de su agujero en un estado restringido tal que sustancialmente no se genera señal fluorescente detectable en el mismo; (b) excitar el marcador fluorescente de cada monómero al salir del nanoporo; (c) medir una señal fluorescente en una zona de transición generada por el marcador fluorescente que sale para identificar el monómero al que está unido el marcador fluorescente; y (d) determinar una secuencia de monómero del polinucleótido a partir de una secuencia de señales fluorescentes. En realizaciones adicionales, los marcadores fluorescentes son aceptores de un par de FRET y uno o más donantes del par de FRET están unidos al nanoporo dentro de una distancia de FRET de la salida.

En algunas realizaciones, "sustancialmente inactivado" como se usa anteriormente significa que un marcador fluorescente genera una señal fluorescente al menos treinta por ciento reducida a partir de una señal generada en las mismas condiciones, pero sin marcadores adyacentes que se inactivan mutuamente. En algunas realizaciones, "sustancialmente inactivado" como se usa anteriormente significa que un marcador fluorescente genera una señal fluorescente al menos cincuenta por ciento reducida a partir de una señal generada en las mismas condiciones, pero sin marcadores adyacentes que se inactivan mutuamente.

En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido objetivo se determina llevando a cabo cuatro reacciones separadas en las que las copias del polinucleótido objetivo tienen cada uno de sus cuatro tipos diferentes de nucleótidos (A, C, G y T) marcados con un marcador fluorescente único. En una variante de tales realizaciones, se determina una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido objetivo llevando a cabo cuatro reacciones separadas en las que las copias del polinucleótido objetivo tienen cada uno de sus cuatro tipos diferentes de nucleótidos (A, C, G y T) marcados con un marcador fluorescente mientras que al mismo tiempo los otros nucleótidos en el mismo polinucleótido objetivo se marcan con un segundo marcador fluorescente. Por ejemplo, si un primer marcador fluorescente se une a los A del polinucleótido objetivo en una primera reacción, entonces un segundo marcador fluorescente se une a los C, los G y los T (es decir, a los nucleótidos "no A") de los polinucleótidos objetivo en la primera reacción. Del mismo modo, en la continuación del ejemplo, en una segunda reacción, el primer marcador se une a las C del polinucleótido objetivo y el segundo marcador fluorescente se une a los A, los G y los T (es decir, a los nucleótidos "no C") del polinucleótido objetivo. Y así sucesivamente, para los nucleótidos G y T.

El mismo esquema de marcación puede expresarse en términos de terminología convencional para subconjuntos de tipos de nucleótidos; de este modo, en el ejemplo anterior, en una primera reacción, un primer marcador fluorescente se une a los A y un segundo marcador fluorescente se une a los B; en una segunda reacción, un primer marcador fluorescente se une a los C y un segundo marcador fluorescente se une a los D; en una tercera reacción, se une un primer marcador fluorescente a los G y un segundo marcador fluorescente a los H; y en una cuarta reacción, un primer marcador fluorescente se une a los T y un segundo marcador fluorescente se une a los V.

En algunas realizaciones, un polinucleótido, se puede marcar con un solo marcador fluorescente unido a un único tipo de monómero, por ejemplo, cada T (o sustancialmente cada T) de un polinucleótido está marcado con un marcador fluorescente, por ejemplo, un colorante de cianina. En tales realizaciones, una colección o secuencia de señales fluorescentes del polinucleótido puede formar una firma o huella digital para el polinucleótido particular. En algunas de tales realizaciones, tales huellas digitales pueden o no proporcionar suficiente información para determinar una secuencia de monómeros.

En algunas realizaciones, una característica de la invención es la marcación de sustancialmente todos los monómeros de un analito polinucleótido con colorantes fluorescentes o marcadores que son miembros de un conjunto que se inactiva mutuamente. El uso del término "sustancialmente todo" en referencia a la marcación de analitos poliméricos es reconocer que las técnicas de marcado químico y enzimático son típicamente menos del 100 por ciento eficientes. En algunas realizaciones, "sustancialmente todo" significa que al menos el 80 por ciento de todos los monómeros tienen marcadores fluorescentes unidos. En otras realizaciones, "sustancialmente todo" significa que al menos el 90 por ciento de todos los monómeros tienen marcadores fluorescentes unidos. En otras realizaciones, "sustancialmente todos" significa que al menos el 95 por ciento de todos los monómeros tienen marcadores fluorescentes unidos. Los conjuntos que se inactivan mutuamente de colorantes fluorescentes tienen las siguientes propiedades: (i) cada miembro inactiva la fluorescencia de cada miembro (por ejemplo, por FRET o por mecanismos estáticos o de contacto), y (ii) cada miembro genera una señal fluorescente distinta cuando se excita y cuando está en un estado no inactivado. Es decir, si un conjunto que se inactiva mutuamente consta de dos colorantes, D1 y D2, entonces (i) D1 se autoinactiva (por ejemplo, mediante inactivación por contacto con otra molécula D1) y se inactiva por D2 (por ejemplo, por inactivación por contacto) y (ii) D2 se autoinactiva (por ejemplo, por inactivación por contacto con otra molécula D2) y se inactiva por D1 (por ejemplo, por inactivación por contacto). En las siguientes referencias se puede encontrar una guía para seleccionar colorantes fluorescentes o marcadores para conjuntos que se inactivan mutuamente: Johansson, *Methods in Molecular Biology*, 335: 17-29 (2006); Marras et al., *Nucleic Acids Research*, 30: e122 (2002); y similares. En algunas realizaciones, los miembros de un conjunto que se inactiva mutuamente comprenden colorantes fluorescentes orgánicos que son componentes o fracciones capaces de apilar interacciones, tales como estructuras de anillos aromáticos. Se pueden seleccionar ejemplos de conjuntos que se inactivan mutuamente de colorantes fluorescentes, o marcadores a partir de colorantes de rodamina, colorantes de fluoresceína y colorantes de cianina. En una realización, un conjunto que se inactiva mutuamente puede comprender el colorante de rodamina, TAMRA, y el colorante de fluoresceína, FAM. En otra realización, se pueden formar conjuntos que se inactivan mutuamente de colorantes fluorescentes seleccionando dos o más colorantes del grupo que consiste en Oregon Green 488, Fluoresceína-EX, isotiocianato de fluoresceína, Rodamina Red-X, rodamine B Lissamina, Calceína, Fluoresceína, Rodamina, uno o más colorantes BODIPY, Texas Red, Oregon Green 514 y uno o más Alexa Fluor. Los colorantes representativos de BODIPY incluyen BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650 y BODIPY 650/665. Los Alexa Fluor representativos incluyen Alexa Fluor 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 y 790.

Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, una secuencia de monómero de un polinucleótido objetivo se determina llevando a cabo reacciones separadas (una para cada tipo de monómero) en las que las copias del polinucleótido objetivo tienen cada una un tipo diferente de monómero marcado con un marcador fluorescente que se inactiva mutuamente o se autoinactiva. En otras realizaciones, una secuencia de monómero de un polinucleótido objetivo se determina llevando a cabo reacciones separadas (una para cada tipo de monómero) en las que las copias del polinucleótido objetivo tienen cada una diferente clase de monómero marcado con un marcador fluorescente diferente que se inactiva mutuamente seleccionado del mismo conjunto que se inactiva mutuamente. En realizaciones en las que un conjunto que se inactiva mutuamente contiene solo dos colorantes, entonces un monómero seleccionado (por ejemplo, el monómero X) se marca con un primer colorante que se inactiva mutuamente y cualquier otro tipo de monómero (es decir, no monómero X) se marca con un segundo colorante que se inactiva mutuamente del mismo

conjunto. Por lo tanto, las etapas de la realización generan una secuencia de dos señales fluorescentes diferentes, una que indica monómero X y otra que indica no monómero X.

En algunas realizaciones, se puede usar un solo marcador fluorescente (por ejemplo, unido a un solo tipo de monómero en un polinucleótido que comprende múltiples tipos de monómeros) que se autoinactiva cuando se une a monómeros adyacentes (del mismo tipo) en un polímero, tal como nucleótidos adyacentes de un polinucleótido. Los ejemplos de marcadores fluorescentes que se autoinactivan incluyen, pero no se limitan a, Oregon Green 488, Fluoresceína-EX, FITC, Rodamina Rojo-X, rodamina B Lisamina, calceína, fluoresceína, rodamina, BODIPYS y Texas Red, por ejemplo, que se divulgan en Molecular Probes Handbook, 11a Edición (2010).

En algunas realizaciones, los marcadores fluorescentes son miembros de un par de FRET. Un par de FRET generalmente es uno o más donantes de FRET y uno o más aceptores de FRET en los que cada donante es capaz de una reacción de FRET con cada aceptor. En un aspecto, esto significa que los donantes del par de FRET tienen un espectro de emisión que se superpone sustancialmente al espectro de absorción de los aceptores. En otro aspecto, el dipolo de transición del donante y el aceptor debe estar alineado de manera que permita una transferencia de energía eficiente. En algunos aspectos, la invención se basa en parte en el descubrimiento y la apreciación de una fluorescencia, en particular, la propiedad de supresión de FRET de los nanoporos y la aplicación de esta propiedad para permitir la detección de polímeros marcados que se translocan a través de un nanoporo. Se cree, aunque la invención no pretende limitarse de ese modo, que se puede seleccionar un nanoporo con un agujero dimensionado de modo que un marcador del par de FRET no pueda orientarse para participar en una interacción de FRET mientras se transloca a través del nanoporo. Los dipolos de los marcadores del polinucleótido en el agujero del nanoporo están restringidos en su libertad de rotación por causa del diámetro limitado del nanoporo. Esta reducción en la alineación de dipolos con la alineación del par de FRET correspondiente unido al nanoporo limita drásticamente la eficiencia de FRET. Los polinucleótidos marcados pueden participar en una interacción de FRET después de salir del nanoporo en cuyo punto el aceptor o donante de FRET en el polinucleótido recupera la libertad de rotación que permite un evento de FRET.

La invención puede tener una amplia gama de realizaciones dependiendo del tipo de analitos que se detecten, los tipos de donantes y aceptores empleados, la disposición física del nanoporo, donantes y aceptores, ya sea que los analitos estén marcados con donantes o con aceptores, y similares. En algunas realizaciones, los analitos medidos por la invención son polinucleótidos marcados con aceptor. En una realización, los diferentes nucleótidos de un analito polinucleotídico se marcan con uno o más tipos diferentes de aceptores, de modo que se puede determinar una secuencia de nucleótidos del polinucleótido midiendo las señales de FRET generadas a medida que se transloca a través de un nanoporo. En otra realización, los analitos medidos por la invención son polinucleótidos marcados con donante. La secuencia del polinucleótido se puede determinar a partir de la medición de las señales de FRET a medida que se transloca a través de un nanoporo. En otra realización más de la presente invención, al menos uno de los cuatro nucleótidos de un analito polinucleotídico está marcado con un miembro de un par de FRET. Las posiciones de los nucleótidos marcados en el polinucleótido se determinan translocando el polinucleótido marcado a través de un nanoporo marcado y midiendo los eventos de FRET. Al marcar los nucleótidos restantes de la misma muestra de polinucleótidos y posteriormente translocar dichas muestras a través de un nanoporo marcado, se generan subsecuencias del polinucleótido. Dichas subsecuencias pueden alinearse dando como resultado una secuencia completa del polinucleótido.

Algunos de los aspectos y realizaciones anteriores de la invención se ilustran esquemáticamente en la Figura 1A. El analito polinucleotídico (1000) es impulsado, por ejemplo, electroforéticamente, a través del nanoporo (1002), que restringe la conformación del polinucleótido (1000) de modo que sus unidades monoméricas se translocan a través del nanoporo en el mismo orden que su secuencia primaria en el polinucleótido. En la realización mostrada en la Figura 1A, se supone que los marcadores fluorescentes son miembros de pares de FRET, pero esto no pretende limitar la presente invención; los marcadores fluorescentes también pueden incluir marcadores fluorescentes que se excitan directamente, por ejemplo con un láser que emite a una longitud de onda apropiada, para generar una señal fluorescente.

Como se mencionó anteriormente, cada vez que una unidad monomérica marcada con un aceptor está dentro del agujero del nanoporo (1002), las interacciones de FRET entre dichos aceptores y los donantes de su par de FRET se suprimen porque los aceptores están en un estado restringido (1014). Dicha supresión generalmente significa que no se produce una señal de FRET detectable, incluso si dichos aceptores están dentro de una distancia de FRET de un donante, por ejemplo, debido a una orientación desfavorable del dipolo del aceptor y del donante, o debido a la inactivación por contacto, o un mecanismo similar. Por otro lado, cuando una unidad monomérica marcada con un aceptor emerge del agujero o sale del nanoporo a la zona (1008) de transición, se produce la interacción (1010) de FRET y se produce la emisión (1016) de FRET y es detecta por el detector (1018) hasta que el aceptor entra en un estado (1011) de autoinactivación con un aceptor adyacente y a medida que la distancia entre el aceptor y el donante aumenta con el movimiento del polímero (1000) fuera de la distancia de interacción de FRET. La señal (1022) es producida por un único aceptor a medida que se mueve a través de la zona (1008) de transición. La zona (1008) de transición, que es una región espacial inmediatamente adyacente a la salida (1015) del nanoporo (1002), está definida por varios factores, incluida la velocidad de translocación del polímero (1000) a través del nanoporo (1002), la movilidad vibracional y rotacional de los marcadores fluorescentes, la naturaleza fisicoquímica de los marcadores fluorescentes y similares. En algunas realizaciones, la zona (1008) de transición puede definirse por una distancia

(1017) perpendicular entre la salida (1015) del nanoporo (1002) y el punto en el que un marcador fluorescente que sale toma una configuración inactivada con un marcador fluorescente adyacente. En algunas realizaciones, la zona (1008) de transición puede definirse por su correspondiente intervalo de transición, o el tiempo que tarda un marcador fluorescente en recorrer la distancia (1017). En algunas realizaciones, la distancia (1017) de transición está en el intervalo de 20 a 50 angstroms; en otras realizaciones, la distancia de transición está en el intervalo de 20 a 40 angstroms. En algunas realizaciones, los intervalos de transición correspondientes están en el intervalo de 0,2 a 2,0 ms; en aún otras realizaciones, los intervalos de transición están en el intervalo de 0,2 a 1,0 ms. En la Figura 1A, solo un tipo de unidad monomérica, ilustrada como círculos (1004) rellenos portan un primer marcador fluorescente (designado como "a"); El resto de las unidades monoméricas, ilustradas como círculos (1006) moteados, portan un segundo marcador fluorescente (designado como "b"). En esta realización, los primeros marcadores fluorescentes inactivan los primeros marcadores fluorescentes adyacentes y los segundos marcadores fluorescentes adyacentes; del mismo modo, los segundos marcadores fluorescentes inactivan los primeros marcadores fluorescentes adyacentes y los segundos marcadores fluorescentes adyacentes; además, el primer y segundo marcadores fluorescentes generan señales de FRET que se pueden distinguir entre sí, por ejemplo, la señal (1022) registrada para el marcador "a" y la señal (1023) registrada para el marcador "b" en la Figura 1A, de modo que cada marcador fluorescente (y por lo tanto, el monómero) pueda identificarse mediante una señal detectada por el detector (1018).

Como se ilustra en la Figura 1B, el grado en que las señales (1022) o (1023) sucesivas se resuelven mediante el detector (1018) depende al menos en parte de la velocidad de translocación del polímero (1000). La curva A y la curva B de la Figura 1B ilustran los resultados de las simulaciones de la generación de señal fluorescente basadas en la ecuación de Forrester en diferentes condiciones de autoinactivación. Como se ilustra, en ambas condiciones se generan señales fácilmente discernibles. En la Figura 1C, una simulación adicional que muestra los picos (1033) de señal se compara con los datos (1035) reales generados como un analito de ADN de cadena sencilla marcado de manera fluorescente translocado a través de un nanoporo. El ADN de cadena sencilla utilizado para generar los datos (1035) tenía una longitud de 200 nt y cada citosina se intercambiaba con una contraparte marcada de manera fluorescente. El ADN marcado se translocó a través de un nanoporo híbrido continuamente excitado a un potencial aplicado de 300 mV y los eventos de FRET se capturaron usando una cámara CMOS operada a una velocidad de adquisición de 2 kHz. En el extremo 3' del ADN marcado, un tramo corto de homopolímero de 3 citosinas consecutivas muestra una fluorescencia de referencia elevada con picos claramente distinguibles para cada una de las tres citosinas. De manera similar a los datos modelados, la traza fluorescente en el recuadro de la Figura 1C muestra una fluorescencia de referencia elevada y picos individuales para cada miembro del tramo de homopolímero. La secuencia de ADN marcada es la siguiente (SEQ ID NO: 1):

```

5'- GCT ATG TGG CGC GGT ATT ATC AAG AAG GAG ACT GAG AGG AGA
GTA GGA GCG AGA AGG AAA CGA GAG TGA GAG GAG AGT AGG AGC
AAG AAG GAA ACG AGA GTG AGA GGA GAG TAG GAG CAA GAA GGA
AAC GAG AGT GAG AGG AGA GTA GGA GCA AGA AGG AAA CTG AGA
GGA GAG TAG GAG TTA CTC TAG CTT CCC GGC AA -3'

```

En algunas realizaciones, un nanoporo es un nanoporo híbrido que comprende un nanoporo de proteína insertado en un poro de una membrana de fase sólida, como se describe más completamente a continuación. En los nanoporos híbridos, un primer miembro de un par de FRET se puede unir directamente al nanoporo de proteína, o alternativamente, directamente a la membrana de fase sólida utilizando químicas de enlace convencional, tales como químicas "clic", por ejemplo, Kolb et al., *Angew. Chem Int. Ed.*, 4: 2004-2021 (2001), o similares. En una realización, un primer miembro de un par de FRET está unido directa o indirectamente al nanoporo de proteína, por ejemplo, como se discute en referencia a la Figura 2D. En otra realización, el primer miembro del par de FRET es un donante y un punto cuántico. Los puntos cuánticos son típicamente mucho más grandes que los aceptores, especialmente los aceptores que son colorantes orgánicos, que típicamente tienen pesos moleculares en el intervalo de 200 a 2.000 daltons.

#### Nanoporos y secuenciación de nanoporos

Los nanoporos utilizados con la invención pueden ser nanoporos de estado sólido, nanoporos de proteínas o nanoporos híbridos que comprenden nanoporos de proteínas o nanotubos orgánicos tales como nanotubos de carbono, configurados en una membrana de estado sólido, o un marco similar. Las características importantes de los nanoporos incluyen (i) obligar a los analitos, particularmente a los analitos poliméricos, a pasar a través de una zona de detección en secuencia, o en otras palabras, de modo que los monómeros pasen la zona de detección de uno en uno, o en una sola fila, (ii) compatibilidad con un medio de translocación, es decir, cualquier método que se utilice para conducir un analito a través de un nanoporo, tal como un campo eléctrico, y (iii) supresión de señales fluorescentes dentro de la luz, o el agujero, del nanoporo, por ejemplo, por inactivación por contacto o similar. Los nanoporos usados en conexión con los métodos y dispositivos de la invención pueden usarse solos o en forma de matrices, ya sea una matriz regular, tal como una matriz rectilínea de una pluralidad de nanoporos en un soporte plano o membrana, o una matriz aleatoria, por ejemplo, en la que una pluralidad de nanoporos están espaciados de acuerdo con una distribución

de Poisson en un soporte plano o membrana.

Los nanoporos pueden fabricarse en una variedad de materiales que incluyen, pero no se limitan a, nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y similares. La fabricación y operación de nanoporos para aplicaciones analíticas, tales como la secuenciación de ADN, se describen en los siguientes ejemplos de referencias: Russell, patente de los Estados Unidos No. 6.528.258; Feier, patente de los Estados Unidos No. 4.161.690; Ling, patente de los Estados Unidos No. 7.678.562; Hu et al., patente de los Estados Unidos No. 7.397.232; Golovchenko et al., patente de los Estados Unidos No. 6.464.842; Chu et al., patente de los Estados Unidos No. 5.798.042; Sauer et al., patente de los Estados Unidos No. 7.001.792; Su et al., patente de los Estados Unidos No. 7.744.816; Church et al., patente de los Estados Unidos No. 5.795.782; Bayley et al., patente de los Estados Unidos No. 6.426.231; Akeson et al., patente de los Estados Unidos No. 7.189.503; Bayley et al., patente de los Estados Unidos No. 6.916.665; Akeson et al., patente de los Estados Unidos No. 6.267.872; Meller et al., publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2009/0029477; Howorka et al., publicación internacional de patente WO2009/007743; Brown et al., publicación internacional de patente WO2011/067559; Meller et al., publicación internacional de patente WO2009/020682; Polonsky et al., publicación internacional de patente WO2008/092760; Van der Zaag et al., publicación internacional de patente WO2010/007537; Yan et al., Nano Letters, 5 (6): 1129-1 134 (2005); Iqbal et al., Nature Nanotechnology, 2: 243-248 (2007); Wanunu et al., Nano Letters, 7 (6): 1580-1585 (2007); Dekker, Nature Nanotechnology, 2: 209-215 (2007); Storm et al., Nature Materials, 2: 537-540 (2003); Wu et al., Electrophoresis, 29 (13): 2754-2759 (2008); Nakane et al., Electrophoresis, 23: 2592-2601 (2002); Zhe et al., J. Micromech. Microeng., 17: 304-313 (2007); Henriquez et al., The Analyst, 129: 478-482 (2004); Jagtiani et al., J. Micromech. Microeng., 16: 1530-1539 (2006); Nakane et al., J. Phys. Condens. Matters, 15 R1365- R1393 (2003); DeBlois et al., Rev. Sci. Instruments, 41 (7): 909-916 (1970); Clarke et al., Nature Nanotechnology, 4 (4): 265-270 (2009); Bayley et al., publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2003/0215881; y similares.

En resumen, en un aspecto, se forma un canal de 1-50 nm a través de un sustrato, generalmente una membrana, a través de la cual se induce a un analito, tal como ADN de cadena sencilla, a translocarse. El enfoque de estado sólido de generar nanoporos ofrece robustez y durabilidad, así como la capacidad de ajustar el tamaño y la forma del nanoporo, la capacidad de fabricar matrices de nanoporos de alta densidad a una escala de obleas, características mecánicas, químicas y térmicas superiores en comparación con sistemas basados en lípidos y la posibilidad de integrarse con técnicas de lectura electrónica u óptica. Los nanoporos biológicos, por otro lado, proporcionan agujeros o luces estrechas reproducibles, especialmente en el intervalo de 1 a 10 nanómetros, así como técnicas para adaptar las propiedades físicas y/o químicas del nanoporo y para unir directa o indirectamente grupos o elementos, tales como marcadores fluorescentes, que pueden ser donantes o aceptores de FRET, por métodos convencionales de ingeniería de proteínas. Los nanoporos de proteína generalmente se basan en delicadas bicapas lipídicas para soporte mecánico, y la fabricación de nanoporos de estado sólido con dimensiones precisas sigue siendo un desafío. La combinación de nanoporos en estado sólido con un nanoporo biológico supera algunas de estas deficiencias, especialmente la precisión de una proteína biológica de poros con la estabilidad de un nanoporo de estado sólido. Para las técnicas de lectura óptica, un nanoporo híbrido proporciona una ubicación precisa del nanoporo que simplifica enormemente la adquisición de datos. La difusión lateral de proteínas de nanoporos insertadas en una bicapa lipídica dificulta la detección óptica. Dado que la parte biológica (es decir, la parte de nanoporos de proteína) de un nanoporo híbrido no depende de la inserción en una bicapa lipídica, los grados de libertad para las modificaciones realizadas a dicha proteína aumentan considerablemente, por ejemplo, una proteína de nanoporos modificada genéticamente que no se inserta espontáneamente en una bicapa lipídica todavía puede usarse como un componente proteico de un nanoporo híbrido. Además, los agentes desestabilizadores de la bicapa, tales como los puntos cuánticos, pueden usarse para marcar un componente de proteína de un nanoporo híbrido.

En el presente documento se describe un método para analizar uno o más analitos poliméricos, tal como la determinación de una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, que comprende las siguientes etapas: (a) translocar un analito polimérico a través de un nanoporo que tiene un agujero y una salida, el analito polimérico comprende una secuencia de monómeros, en el que sustancialmente cada monómero está marcado con un marcador fluorescente de tal manera que los marcadores fluorescentes de los monómeros adyacentes están en un estado inactivado por autoinactivación entre sí fuera del nanoporo y los marcadores fluorescentes están en un estado estéricamente restringido e incapaces de generar una señal fluorescente detectable dentro del nanoporo; (b) excitar cada marcador fluorescente a la salida del nanoporo a medida que pasa de un estado restringido estéricamente a un estado inactivado para que se genere una señal fluorescente que sea indicativa del monómero al que está unido; (c) detectar la señal fluorescente para identificar el monómero. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente cada uno", "sustancialmente todos", o términos similares, en referencia a los monómeros de marcación, particularmente los nucleótidos, reconoce que los procedimientos de marcación química pueden no dar como resultado la marcación completa de cada monómero; en la medida de lo posible, los términos incluyen que las reacciones de marcación en relación con la invención continúan hasta su finalización; en algunas realizaciones, tales reacciones de marcación completadas incluyen la marcación de al menos el cincuenta por ciento de los monómeros; en otras realizaciones, tales reacciones de marcación incluyen marcar al menos el ochenta por ciento de los monómeros; en otras realizaciones, tales reacciones de marcación incluyen marcar al menos el noventa y cinco por ciento de los monómeros; en otras realizaciones, tales reacciones de marcación incluyen marcar al menos el noventa y nueve por ciento de los monómeros.

En el presente documento se describe un método para analizar uno o más analitos poliméricos que comprende las

siguientes etapas: (a) unir un marcador fluorescente sustancialmente a cada monómero de uno o más analitos poliméricos de modo que los marcadores fluorescentes de los monómeros adyacentes estén en un estado inactivado, (b) translocar los analitos poliméricos a través de nanoporos para que los monómeros de cada analito polimérico atraviesen el nanoporo en una sola fila y en el que cada nanoporo tenga un agujero y una salida, el agujero restringe estéricamente las marcadores fluorescentes en un estado restringido que no se genera ninguna señal fluorescente a partir del interior del agujero; (c) excitar durante un intervalo de transición cada marcador fluorescente a la salida del nanoporo a medida que cada marcador fluorescente pasa de un estado restringido estéricamente a un estado inactivado, generando así una señal fluorescente que es indicativa del monómero al que está unido; (c) detectar la señal fluorescente para identificar el monómero.

En el presente documento se describe un dispositivo para analizar uno o más analitos poliméricos marcados, tal como un dispositivo para determinar una secuencia de nucleótidos de uno o más analitos polinucleotídicos marcados, dicho dispositivo comprende los siguientes elementos: (a) una membrana de fase sólida que separa una primera cámara y una segunda cámara, la membrana de fase sólida que tiene al menos un nanoporo que conecta de manera fluida la primera cámara y la segunda cámara a través de un agujero o luz, el agujero o la luz tiene una dimensión de sección transversal tal que los marcadores de un polímero marcado que se translocan a través del mismo están restringidos estéricamente para que no se generen señales detectables, y para que los marcadores de los monómeros adyacentes del polímero marcado se autoinactiven; (b) una fuente de excitación para excitar cada marcador cuando sale del nanoporo y entra en la segunda cámara para que se genere una señal indicativa de un monómero al que está unido el marcador; y (c) un detector para recoger al menos una parte de la señal generada por cada marcador excitado; y (d) identificar el monómero al que se une el marcador excitado por la señal recogida.

En el presente documento se describe un sistema para analizar polímeros que comprenden un polímero que comprende monómeros que están sustancialmente todos marcados con un conjunto de colorantes que se inactivan mutuamente y un dispositivo de nanoporos para detectar secuencialmente señales ópticas de los colorantes del conjunto de colorantes que se inactivan mutuamente que se unen al polímero. Tal realización para determinar una secuencia de un polinucleótido puede comprender los siguientes elementos: (a) una membrana de fase sólida que separa una primera cámara y una segunda cámara, la membrana de fase sólida tiene al menos una abertura que conecta la primera cámara y la segunda cámara, y que tiene un recubrimiento hidrófobo en al menos una superficie; (b) una capa lipídica dispuesta sobre el recubrimiento hidrófobo; (c) un nanoporo de proteína inmovilizada en la abertura, el nanoporo de proteína tiene un agujero con una salida, y el nanoporo de proteína interactúa con la capa lipídica para formar un sello con la membrana de fase sólida en la abertura para que la comunicación fluida entre la primera cámara y la segunda cámara se produzca únicamente a través del agujero del nanoporo de proteína, y el nanoporo de proteína se dimensiona de forma transversal para que los nucleótidos del polinucleótido pasen a través de la salida del agujero en secuencia y para que los marcadores fluorescentes unidos al polinucleótido estén restringidos estéricamente de modo que la generación de señal fluorescente en el mismo se inhibe o previene; y (d) un primer miembro del par de FRET unido a la membrana de fase sólida o al nanoporo de proteína, de modo que cada vez que los nucleótidos del polinucleótido emergen del agujero, una pluralidad de nucleótidos está dentro de una distancia de FRET del primer miembro del par de FRET. En algunos casos, el primer miembro del par de FRET es un punto cuántico que funciona como un donante de FRET.

En algunos casos, el recubrimiento hidrófobo es opcional porque la superficie de la membrana de fase sólida es suficientemente hidrófoba en sí misma de modo que una capa lipídica se adhiere a ella de manera estable. Al menos una abertura tendrá una superficie interna, o pared, conectada o contigua a las superficies de la membrana de fase sólida. En algunos casos, al menos una abertura será una pluralidad de aberturas, y la pluralidad de aberturas puede estar dispuesta como una matriz regular, tal como una matriz rectilínea de aberturas, cuya separación depende en parte del número y tipo de pares de FRET empleados y el sistema de detección óptico utilizado. Cada una de las aberturas tiene un diámetro, que en algunos casos es tal que un nanoporo de proteína está sustancialmente inmovilizado en su interior. En algunos casos, sustancialmente inmovilizado significa que un nanoporo de proteína puede moverse no más de 5 nm en el plano de la membrana de fase sólida con respecto a la pared de la abertura. En otro caso, sustancialmente inmovilizado significa que un nanoporo de proteína puede moverse no más de 5 nm en el plano de la membrana de fase sólida con respecto a la pared de la abertura. Cada uno de los nanoporos de proteína tiene un agujero, o pasaje, o luz, que permite la comunicación fluida entre la primera y la segunda cámara cuando el nanoporo de proteína se inmoviliza en una abertura. Generalmente, el agujero está alineado coaxialmente con la abertura. Una función de la capa hidrófoba es proporcionar una superficie para retener los lípidos en y/o inmediatamente adyacentes a al menos una abertura. Tales lípidos, a su vez, permiten la disposición e inmovilización de un nanoporo de proteína dentro de una abertura en una conformación funcional y de una manera que forma un sello fluido con la pared de la abertura. En algunos casos, dicho sello también evita que la corriente eléctrica pase entre la primera y segunda cámaras alrededor del nanoporo de proteína. En algunos casos, los analitos cargados se disponen en una solución electrolítica en la primera cámara y se translocan a través del agujero u agujeros del nanoporo o nanoporos de proteína en una solución electrolítica en la segunda cámara estableciendo un campo eléctrico a través de la membrana de fase sólida. Por conveniencia de fabricación, en algunos casos, el recubrimiento hidrófobo estará sobre una superficie de la membrana de fase sólida y la pared o paredes de la abertura o aberturas.

En algunos dispositivos descritos en el presente documento, al menos un nanoporo en una membrana de fase sólida es una pluralidad de nanoporos, o una matriz de nanoporos; en algunas casos, dichos nanoporos están separados regularmente en la membrana de fase sólida con sus agujeros orientados perpendicularmente al plano de la membrana

de fase sólida. En algunos casos, los nanoporos están espaciados en un patrón rectilíneo en la membrana de fase sólida; en otros casos, los nanoporos están espaciados en un patrón aleatorio en la membrana de fase sólida; en algunos casos, dicho patrón aleatorio es la distribución de Poisson. En algunos casos, los nanoporos están regularmente espaciados en una membrana de fase sólida con una distancia mínima entre nanoporos de al menos 10 nm; en otros casos, dicha distancia mínima entre nanoporos es de 50 nm; en otros casos, dicha distancia mínima entre nanoporos es de 100 nm; en otros casos, dicha distancia mínima entre nanoporos es de 200 nm; en otros casos, dicha distancia mínima entre nanoporos es de 500 nm.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden una membrana de fase sólida, tal como una membrana de SiN, que tiene una matriz de aberturas a través de la misma que proporcionan comunicación entre una primera cámara y una segunda cámara (a veces también denominada "cámara cis" y una "cámara trans") y que soporta una bicapa lipídica en una superficie que da frente a la segunda cámara o cámara trans. En algunas realizaciones, los diámetros de la abertura en dicha membrana de fase sólida pueden estar en el intervalo de 10 a 200 nm, o en el intervalo de 20 a 100 nm. En algunas realizaciones, tales membranas de fase sólida incluyen además nanoporos de proteínas insertados en la bicapa lipídica en regiones en las que dicha bicapa abarca las aberturas en la superficie que da frente a la cámara trans. En algunas realizaciones, dichos nanoporos de proteínas se insertan desde el lado cis de la membrana de fase sólida usando técnicas descritas en este documento. En algunas realizaciones, dichos nanoporos de proteína tienen una estructura idéntica o similar a la  $\alpha$ -hemolisina en el sentido de que comprende un barril o agujero, a lo largo de un eje y en un extremo tiene una estructura de "tapa" y en el otro extremo tiene una estructura de "tallo" (usando la terminología de Song et al., *Science*, 274: 1859-1866 (1996)). En algunas realizaciones que usan dichos nanoporos de proteína, la inserción en la bicapa lipídica da como resultado que el nanoporo de proteína esté orientado de modo que su estructura de tapa esté expuesta a la cámara cis y su estructura de tallo a la cámara trans.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden bicapas de interfaz de gotas, ya sea como gotas individuales o como gotas de matrices, por ejemplo, como se describe en Bayley et al., publicación de patente de los Estados Unidos No. 2014/0356289; Huang et al., *Nature Nanotecnología*, 10.1038/nnano.2015.189. [Epub ya disponible]; o referencia similar. En resumen, los nanoporos de proteínas (1,2 nM) se colocan en una gota de 200-350 nL (por ejemplo, KCl 1,32 M, HEPES 8,8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 7,0 ( $\alpha$ HL) o 8,0 (MspA), y se incuban, por ejemplo, 1,2-difitanoil-sn-glycero-3-fosfolina (DPhPC) 3 mM en hexadecano para formar un recubrimiento de monocapa lipídica. Luego se puede transferir una gotita pipeteando sobre un cubreobjetos en una cámara de medición, por ejemplo, que permite la aplicación de voltajes para mover analitos y detección óptica, por ejemplo, mediante TIRF. El cubreobjetos puede ser recubierto por centrifugación (3.000 rpm, 30 s) con una capa delgada (~200 nm) de agarosa (CaCl<sub>2</sub> 0,66 M, HEPES 8,8 mM, pH 7,0 ( $\alpha$ HL)/(MspA) 8,0) y posteriormente incubada con DPhPC 3 mM en hexadecano. En contacto con la monocapa en la agarosa, una gota recubierta de lípidos forma espontáneamente una bicapa de interfaz de gotas. Se puede insertar un electrodo de tierra (Ag/AgCl) en la gota, con un electrodo activo correspondiente (Ag/AgCl) en el sustrato de agarosa. Los protocolos de voltaje pueden aplicarse con un amplificador de abrazadera de parche (por ejemplo, Axopatch 200B, Molecular Devices). Los nanoporos presentes en la gota se insertan espontáneamente en la bicapa de interfaz de la gota, y el flujo de iones puede detectarse tanto eléctrica como ópticamente (por ejemplo, por medio de un colorante sensible a los iones, tal como Fluo-8, o similar).

En algunas realizaciones, la membrana de fase sólida puede tratarse con un haz de iones de baja energía para blanquear su autofluorescencia, por ejemplo, como se describe en Huber et al., publicación de patente de Estados Unidos No. 2013/0203050.

Las Figuras 2A-2C son diagramas de biosensores híbridos. Se perfora un orificio (102) de tamaño de un nanómetro en un sustrato de estado sólido o membrana (103) de fase sólida que separa dos cámaras o compartimientos (101) cis y trans (107). Un biosensor (104) de proteínas (por ejemplo, un nanoporo de proteínas) unido a un polímero (105) cargado, tal como un ADN de cadena sencilla, se incrusta en el nanoorificio de estado sólido mediante transporte electroforético. En la Figura 1C se inserta el biosensor de proteínas. En un orificio de tamaño de un nanómetro, cuya superficie tiene un recubrimiento (106) hidrófobo y una capa (109) lipídica unida al mismo. Un nanoporo puede tener dos lados u orificios. Un lado se conoce como el lado "cis" y mira hacia el electrodo negativo (-) o un compartimento o solución de tampón/iónica cargada negativamente. El otro lado se conoce como el lado "trans" y mira hacia el electrodo (+) o un compartimento o solución de tampón/iónica cargada positivamente. Un polímero biológico, tal como una molécula de ácido nucleico o polímero marcados puede ser atraído o impulsado a través del poro mediante un campo eléctrico aplicado a través del nanoporo, por ejemplo, entrando en el lado cis del nanoporo y saliendo por el lado trans del nanoporo.

La Figura 2D muestra el nanoporo (104) de proteína insertado en una abertura perforada en una membrana (103) de estado sólido. Unido al nanoporo (104) de proteína hay un oligonucleótido (108) con el que se hibrida un oligonucleótido (111) secundario complementario. Dicho oligonucleótido (111) secundario tiene uno o más segundos miembros de un par (110) de FRET unido a él. Alternativamente, un miembro de un par de FRET puede unirse directamente a un aminoácido de un nanoporo de proteína. Por ejemplo, una subunidad de hemolisina puede modificarse mediante técnicas de ingeniería genética convencionales para sustituir una cisteína por un aminoácido ubicado convenientemente adyacente a la salida del nanoporo, por ejemplo, la treonina 129. Se puede unir un oligonucleótido o miembros de un par de FRET a través del grupo tío de la cisteína usando productos químicos enlazadores convencionales, por ejemplo, Hermanson (citado anteriormente).

En algunas realizaciones, la presente invención emplea un nanoporo híbrido, particularmente para la secuenciación de polinucleótidos de nanoporos de forma óptica. Dichas realizaciones comprenden un orificio de estado sólido, o abertura, en la que se inserta de manera estable un biosensor de proteínas, tal como un nanoporo de proteínas. Se puede unir un nanoporo de proteína (por ejemplo, hemolisina alfa) a un polímero cargado (por ejemplo, ADN de cadena doble) que sirve como fuerza de arrastre en un campo eléctrico aplicado, y que se puede usar para guiar un nanoporo de proteína hacia una abertura en una membrana de estado sólido. En algunas realizaciones, la abertura en el sustrato de estado sólido se selecciona para que sea ligeramente más pequeña que la proteína, evitando así que se transloque a través de la abertura. En cambio, la proteína se incrustará en el orificio de estado sólido. El sustrato de estado sólido se puede modificar para generar sitios activos en la superficie que permitan la unión covalente del biosensor de proteína conectado dando como resultado un biosensor híbrido estable.

El sitio de unión del polímero en el biosensor puede generarse mediante ingeniería de proteínas, por ejemplo, se puede construir una proteína mutante que permita la unión específica del polímero. Como ejemplo, se puede insertar un residuo de cisteína en la posición deseada de la proteína. La cisteína puede reemplazar un aminoácido natural o puede incorporarse como un aminoácido de adición. Se debe tener cuidado de no interrumpir la función biológica de la proteína. El grupo amino primario terminal de un polímero (es decir, ADN) se activa luego usando un agente de entrecruzamiento heterobifuncional (por ejemplo, SMCC). Posteriormente, el polímero activado se une covalentemente al residuo de cisteína del biosensor de proteínas. En algunas realizaciones, la unión del polímero al biosensor es reversible. Mediante implementación de un agente de entrecruzamiento escindible, se introduce un enlace químico fácilmente rompible (por ejemplo, un enlace S-S) y el polímero cargado puede retirarse después de la inserción del biosensor en la abertura de estado sólido.

Para alguien experto en la técnica, es obvio que es posible una amplia variedad de enfoques diferentes para métodos de unión covalentes o no covalentes de un polímero cargado al biosensor de proteínas y el enfoque descrito anteriormente sirve simplemente como un ejemplo. El experto en la materia también se dará cuenta de que se puede usar una variedad de polímeros diferentes como fuerza de arrastre, que incluyen, entre otros, ADN de cadena sencilla o doble, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poli-L-lisina, polisacáridos lineales, etc. También es obvio que estos polímeros pueden presentar una carga negativa (-) o positiva (+) a un pH dado y que la polaridad del campo eléctrico puede ajustarse en consecuencia para atraer el complejo polímero-biosensor a una abertura de estado sólido. En algunas realizaciones, se une un fluoróforo donante al nanoporo de proteína. Luego, este complejo se inserta en una abertura o nano orificio de estado sólido (por ejemplo, 3-10 nm de diámetro) aplicando un campo eléctrico a través del nano orificio de estado sólido hasta que el nanoporo de proteína se transporta al nano orificio de estado sólido para formar un nanoporo híbrido. La formación del nanoporo híbrido puede verificarse mediante (a) la inserción del nanoporo de proteína que causa una caída en la corriente en función de un bloqueo parcial del nano orificio de estado sólido y (b) la detección óptica del fluoróforo donante.

Una vez que se han formado nanoporos híbridos estables, se agrega ADN de cadena sencilla, marcado de manera fluorescente (o marcado con aceptor) a la cámara cis (la cámara con el electrodo (+)). El campo eléctrico aplicado obliga al ADN de cadena sencilla cargado negativamente a translocarse a través del nanoporo híbrido durante el cual los nucleótidos marcados se acercan al fluoróforo donante.

Los nanoporos de estado sólido o sintéticos pueden prepararse de diversas maneras, como se ejemplifica en las referencias citadas anteriormente. En algunas realizaciones, se puede usar un microscopio de iones de helio para perforar los nanoporos sintéticos en una variedad de materiales, por ejemplo, como lo describen Yang et al., Nanotechnology, 22: 285310 (2011). Un chip que soporta una o más regiones de un material de película delgada, por ejemplo, nitruro de silicio, que ha sido procesado para ser una membrana sin soporte, se introduce en la cámara del microscopio de iones de helio (HIM). Los controles del motor del HIM se utilizan para llevar una membrana sin soporte a la trayectoria del haz de iones mientras el microscopio está configurado para un bajo aumento. Los parámetros del haz, incluidos el foco y la astigmatización, se ajustan en una región adyacente a la membrana sin soporte, pero en el sustrato sólido. Una vez que los parámetros se han fijado correctamente, la posición del chip se mueve de modo que la región de la membrana sin soporte se centre en la región de barrido del haz de iones y el haz quede en blanco. El campo de visión del HIM se fija en una dimensión (en  $\mu\text{m}$ ) que es suficiente para contener todo el patrón de nanoporos previsto y suficiente para ser útil en futuras lecturas ópticas (es decir, depende del aumento de la óptica, resolución de la cámara, etc.). El haz de iones se rasteriza una vez a través de todo el campo de visión en un tiempo de permanencia de píxeles que da como resultado una dosis total de iones suficiente para eliminar toda o la mayor parte de la autofluorescencia de la membrana. El campo de visión se fija en el valor adecuado (más pequeño que el utilizado anteriormente) para realizar la molienda definida litográficamente de un solo nanoporo o una matriz de nanoporos. El tiempo de permanencia de píxeles del patrón se fija para dar lugar a nanoporos de uno o más diámetros predeterminados, determinados mediante el uso de una muestra de calibración antes del procesamiento de la muestra. Todo este proceso se repite para cada región deseada en un solo chip y/o para cada chip introducido en la cámara del HIM.

En algunas realizaciones, el sustrato de estado sólido puede modificarse para generar sitios activos en la superficie que permitan la unión covalente del biosensor de proteína enchufado o para modificar las propiedades de la superficie de manera que sea más adecuada para una aplicación dada. Dichas modificaciones pueden ser de naturaleza covalente o no covalente. Una modificación de la superficie covalente incluye una etapa de silanización en la que un compuesto de organosilano se une a grupos de silanol en la superficie sólida. Por ejemplo, los grupos alcoxi de un

alcoxisilano se hidrolizan para formar especies que contienen silanol. La reacción de estos silanos implica cuatro etapas. Inicialmente, se produce la hidrólisis de los grupos lábiles. Sigue la condensación a oligómeros. Los oligómeros se unen luego mediante enlace de hidrógeno con grupos hidroxilo del sustrato. Finalmente, durante el secado o curado, se forma un enlace covalente con el sustrato con pérdida concomitante de agua. Para la unión covalente se pueden emplear organosilanos con grupos laterales activos. Dichos grupos laterales consisten, pero no se limitan a, cadenas laterales epoxídicas, aldehídos, isocianatos, isotiocianatos, azidas o alquinos (química clic), por nombrar algunos. Para alguien experto en la materia, es obvio que son posibles múltiples formas de unir covalentemente una proteína a una superficie. Por ejemplo, ciertos grupos secundarios en un organosilano pueden necesitar ser activados antes de poder unirse a una proteína (por ejemplo, aminas primarias o grupos laterales carboxilo activados con un N-hidroxisuccinimidilester). Otra forma de unir una proteína a la superficie sólida se puede lograr a través de la unión por afinidad al tener un compañero de afinidad unido a la proteína y el segundo compañero de afinidad ubicado en la superficie sólida. Tales pares de afinidad consisten en el grupo de, pero no se limitan a, biotina-estreptavidina, antígeno-anticuerpo y aptámeros y las moléculas objetivo correspondientes. En una realización preferida, la modificación de la superficie del nanoporo en estado sólido incluye el tratamiento con un organosilano que hace que la superficie sea hidrófoba. Dichos organosilanos incluyen, entre otros, alcanosilanos (por ejemplo, octadecildimetilclorosilano) o alcanosilanos modificados tales como alcanosilanos fluorados con una longitud de cadena de alcano de 5 a 30 carbonos. La superficie hidrófoba se trata luego con una solución diluida de un lípido en pentano. Después de secar el disolvente y sumergir la superficie en una solución acuosa, el lípido formará espontáneamente una capa en la superficie. Una capa de lípidos en la superficie sólida podría ser beneficiosa para la formación de un nanoporo híbrido. La capa lipídica en la fase sólida podría reducir la corriente de fuga entre la proteína y el nanoporo de estado sólido y podría aumentar la estabilidad del poro de la proteína insertada. La combinación de un sustrato sólido de baja capacitancia, así como un recubrimiento lipídico de dicho sustrato, puede hacer que el sistema de nanoporos híbrido sea susceptible de una lectura eléctrica basada en las fluctuaciones de corriente generadas por la translocación de ADN a través del nanoporo híbrido. Para lograr la lectura eléctrica con dicho sistema, se debe combinar un medio para disminuir la velocidad de translocación del ADN no modificado con un nanoporo híbrido recubierto de lípidos. Los motores moleculares como las polimerasas o helicasas se pueden combinar con un nanoporo híbrido y reducir de manera efectiva la velocidad de translocación del ADN a través del nanoporo híbrido. Los lípidos utilizados para recubrir la superficie son del grupo de los esfingolípidos, fosfolípidos o esteroides. Un método y/o sistema para secuenciar un polímero o molécula biológica (por ejemplo, un ácido nucleico) puede incluir excitar uno o más marcadores donantes unidos a un poro o nanoporo. Un polímero biológico puede translocarse a través del poro o nanoporo, en el que un monómero del polímero biológico está marcado con uno o más marcadores aceptores. La energía puede transferirse desde el marcador del donante excitado al marcador del aceptor del monómero cuando, después de que el monómero marcado atraviesa, sale o entra al poro o al nanoporo. La energía emitida por el marcador del aceptor como resultado de la transferencia de energía puede detectarse, donde la energía emitida por el marcador aceptor puede corresponder o estar asociada con un monómero único o particular (por ejemplo, un nucleótido) de un polímero biológico. La secuencia del polímero biológico se puede deducir o secuenciar basándose en la detección de la energía emitida por el marcador del aceptor del monómero que permite la identificación del monómero marcado. Se puede utilizar un poro, nanoporo, canal o pasaje, por ejemplo, un poro, nanoporo, canal o pasaje permeable a iones en los sistemas y métodos descritos en el presente documento.

Un nanoporo, o poro, puede marcarse con uno o más marcadores donantes. Por ejemplo, el lado o superficie cis y/o el lado o superficie trans del nanoporo pueden marcarse con un o más marcadores donantes. El marcador puede estar unido a la base de un poro o nanoporo o a otra porción o monómero que forma el nanoporo o poro. Un marcador puede estar unido a una porción de la membrana o sustrato a través de la cual se extiende un nanoporo o a un enlazador u otra molécula unida a la membrana, sustrato o nanoporo. El marcador de nanoporos o poros se puede colocar o unir en el nanoporo, sustrato o membrana de modo que el marcador de poros pueda acercarse a un marcador del aceptor de un polímero biológico, por ejemplo, un ácido nucleico, que se transloca a través del poro. Los marcadores de los donantes pueden tener los mismos o diferentes espectros de emisión o absorción. La marcación de una estructura de poros puede lograrse mediante interacciones covalentes o no covalentes. Un marcador del donante (también denominada a veces "marcador de poro") puede colocarse lo más cerca posible de la abertura, por ejemplo, la salida de un nanoporo sin causar una oclusión que impida la translocación de un ácido nucleico a través del nanoporo. Un marcador de poro puede tener una variedad de propiedades y/o características adecuadas. Por ejemplo, un marcador de poro puede tener propiedades de absorción de energía que cumplan requisitos particulares. Un marcador de poro puede tener una gran sección transversal de absorción de energía de radiación, que varía, por ejemplo, de aproximadamente 0 a 1000 nm o de aproximadamente 200 a 500 nm. Un marcador de poro puede absorber la radiación dentro de un intervalo de energía específico que es mayor que la absorción de energía del marcador de ácido nucleico, tal como un marcador del aceptor. La energía de absorción del marcador de poro puede sincronizarse con respecto a la energía de absorción de un marcador de ácido nucleico para controlar la distancia a la que puede ocurrir la transferencia de energía entre los dos marcadores. Un marcador de poro puede ser estable y funcional durante al menos  $10^6$  a  $10^9$  ciclos de excitación y transferencia de energía.

Marcadores para nanoporos y analitos

En algunas realizaciones, un nanoporo puede marcarse con uno o más puntos cuánticos. En particular, en algunas realizaciones, uno o más puntos cuánticos pueden estar unidos a un nanoporo, o unidos a un soporte de fase sólida adyacente (y dentro de una distancia de FRET de una entrada o salida de un nanoporo), y emplearse como donantes

en reacciones de FRET con aceptores en analitos. Tales usos de los puntos cuánticos son bien conocidos y se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, tales como en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.252.303; 6.855.551; 7.235.361; y similares.

5 Un ejemplo de un punto cuántico que se puede utilizar como marcador de poro es un punto cuántico de CdTe que se puede sintetizar en una solución acuosa. Un punto cuántico de CdTe puede funcionalizarse con un grupo nucleofílico tal como aminos primarios, tioles o grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos. Un punto cuántico de CdTe puede incluir un ligando de protección de ácido mercaptopropiónico, que tiene un grupo funcional de ácido carboxílico que puede utilizarse para unir covalentemente un punto cuántico a una amina primaria en el exterior de un poro de proteína. La reacción de entrecruzamiento puede llevarse a cabo usando reactivos de entrecruzamiento estándar (homo bifuncionales así como heterobifuncionales) que son conocidos por los expertos en la técnica de bioconjugación. Se debe tener cuidado para asegurar que las modificaciones no perjudiquen o perjudiquen sustancialmente la translocación de un ácido nucleico a través del nanoporo. Esto se puede lograr variando la longitud de la molécula de entrecruzamiento empleada utilizada para unir el marcador del donante al nanoporo.

15 Por ejemplo, la amina primaria del residuo de lisina 131 de la proteína natural hemolisina alfa (Song, L. et al., Science 274, (1996): 1859-1866) puede usarse para unir covalentemente puntos cuánticos de CdTe modificado en el carboxilo a través de la química de acoplamiento de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/NHS). Alternativamente, el aminoácido 129 (treonina) puede intercambiarse por cisteína. Como no hay otro residuo de cisteína en la proteína de hemolisina alfa natural, el grupo lateral tiol de la cisteína recién insertada puede usarse para unir covalentemente otras fracciones químicas.

20 Se puede utilizar una variedad de métodos, mecanismos y/o rutas para unir uno o más marcadores de poro a una proteína del poro. Una proteína del poro puede ser modificada genéticamente de manera que introduzca aminoácidos con propiedades conocidas o varios grupos funcionales en la secuencia de proteína natural. Tal modificación de una secuencia de proteína natural puede ser ventajosa para la bioconjugación de puntos cuánticos a la proteína del poro. Por ejemplo, la introducción de un residuo de cisteína introduciría un grupo tiol que permitiría la unión directa de un punto cuántico, tal como un punto cuántico de CdTe, a una proteína del poro. Además, la introducción de un residuo de lisina introduciría una amina primaria para la unión a un punto cuántico. La introducción de ácido glutámico o ácido aspártico introduciría una fracción de ácido carboxílico para la unión a un punto cuántico. Estos grupos son susceptibles de bioconjugación con un punto cuántico usando moléculas de entrecruzamiento homo o heterobifuncionales. Dichas modificaciones a las proteínas de poros destinadas a la introducción de grupos funcionales para bioconjugación son conocidas por los expertos en la materia. Se debe tener cuidado para garantizar que las modificaciones no perjudiquen o perjudiquen sustancialmente la translocación de un ácido nucleico a través del nanoporo.

35 El marcador de nanoporos puede unirse a un nanoporo de proteína antes o después de la inserción de dicho nanoporo en una bicapa lipídica. Cuando se adhiere un marcador antes de la inserción en una bicapa lipídica, se debe tener cuidado de marcar la base del nanoporo y evitar la marcación aleatoria de la proteína del poro. Esto se puede lograr mediante la ingeniería genética de la proteína del poro para permitir la unión específica al sitio del marcador de poro, como se describe a continuación. Una ventaja de este enfoque es la producción en masa de nanoporos marcados. Alternativamente, una reacción de marcación de un nanoporo previamente insertado puede asegurar la unión específica al sitio del marcador con la base (lado trans) del nanoporo sin modificar genéticamente la proteína del poro.

40 Un polímero biológico, por ejemplo, una molécula o polímero de ácido nucleico, puede marcarse con un o más marcadores del aceptor. Para una molécula de ácido nucleico, cada uno de los cuatro nucleótidos o bloques de construcción de una molécula de ácido nucleico puede marcarse con un marcador del aceptor creando así una contraparte marcada (por ejemplo, fluorescente) para cada nucleótido natural. El marcador del aceptor puede estar en forma de una molécula de aceptación de energía que se puede unir a uno o más nucleótidos en una porción o en la cadena completa de un ácido nucleico convertido.

45 Se pueden utilizar una variedad de métodos para marcar los monómeros o nucleótidos de una molécula o polímero de ácido nucleico. Se puede incorporar un nucleótido marcado en un ácido nucleico durante la síntesis de un nuevo ácido nucleico utilizando la muestra original como plantilla ("marcación por síntesis"). Por ejemplo, la marcación de ácido nucleico se puede lograr mediante PCR, amplificación del genoma completo, amplificación de círculo rodante, extensión de cebador o similar o mediante diversas combinaciones y extensiones de los métodos anteriores conocidos por personas con conocimientos ordinarios en la técnica.

50 La marcación de un ácido nucleico se puede lograr replicando el ácido nucleico en presencia de un análogo de nucleótido modificado que tiene un marcador, lo que conduce a la incorporación de ese marcador en el ácido nucleico recién generado. El proceso de marcación también puede lograrse incorporando un análogo de nucleótido con un grupo funcional que puede usarse para unir covalentemente una fracción que acepta energía en una etapa de marcación secundaria. Dicha replicación también se puede lograr mediante la amplificación del genoma completo (Zhang, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992): 5847) o la amplificación de desplazamiento de cadena tal como la amplificación de círculo rodante, traducción de muesca, transcripción, transcripción inversa, extensión del cebador y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con cebador oligonucleotídico degenerado (DOP-PCR) (Telenius, H. et al., Genomics 13 (1992): 718-725) o combinaciones de los métodos anteriores.

Un marcador puede comprender un grupo reactivo tal como un nucleófilo (aminas, tioles, etc.). Dichos nucleófilos, que no están presentes en los ácidos nucleicos naturales, se pueden usar para unir marcadores fluorescentes mediante química reactiva con amina o tiol, tales como ésteres de NHS, maleimidias, anillos epoxi, isocianatos, etc. Tales colorantes fluorescentes reactivos con nucleófilos (es decir, colorantes de NHS) están disponibles comercialmente de diferentes fuentes. Una ventaja de marcar un ácido nucleico con nucleófilos pequeños radica en la alta eficiencia de incorporación de tales nucleótidos marcados cuando se usa un enfoque de "marcado por síntesis". Los bloques de construcción voluminosos de ácido nucleico marcados de manera fluorescente pueden estar mal incorporados por las polimerasas debido al impedimento estérico de los marcadores durante el proceso de polimerización en el ADN recién sintetizado.

En algunas realizaciones, el ADN puede modificarse químicamente directamente sin la incorporación mediada por polimerasa de nucleótidos marcados. Un ejemplo de una modificación incluye colorantes que contienen cis-platino que modifican las bases de guanina en su posición N7 (Hoevel, T. et al., *Bio Techniques* 27 (1999): 1064-1067). Otro ejemplo incluye la modificación de pirimidinas con hidroxilamina en la posición C6 que conduce a derivados de 6-hidroxilamino. Los grupos amina resultantes pueden modificarse adicionalmente con colorantes reactivos con amina (por ejemplo, NHS-Cy5). Otro ejemplo más son los nucleótidos modificados con azida o alquino que se incorporan fácilmente por las polimerasas (Gierlich et al., *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 9486-0404). El polinucleótido modificado con alquino o azida se marca posteriormente con un fluoróforo modificado con azida o alquino siguiendo protocolos de química clic bien establecidos.

Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, el ADN puede marcarse usando "química clic", por ejemplo, utilizando kits disponibles comercialmente (tal como "Click-It" de Life Technologies, Carlsbad, CA). La química clic en general se refiere a un proceso de síntesis en el que dos moléculas se unen por una reacción química altamente eficiente, una que es esencialmente irreversible, en la que el rendimiento es casi del 100% y que produce pocos o ningún subproducto de reacción. Más recientemente, el significado se ha referido a la reacción de ciclación de un alquino sustituido con una azida sustituida para formar un 1,2,3-triazol que porta los dos sustituyentes. Cuando la reacción es catalizada por cobre a temperatura ambiente, se conoce como cicloadición de Huisgen, y satisface completamente los requisitos para la química clic, ya que ninguna otra funcionalidad química en las dos moléculas se ve afectada durante la reacción. Por lo tanto, la reacción de acoplamiento ha encontrado una amplia aplicación en la química de bioconjugados, por ejemplo, en la marcación de colorantes de ADN o proteínas, en las que se pueden encontrar muchos grupos amina, hidroxilo o tiol. El requisito clave es que un grupo alquino y una azida se puedan introducir fácilmente en las moléculas a acoplar. Por ejemplo, en el acoplamiento de un colorante fluorescente a un oligonucleótido de ADN, el grupo azida se introduce típicamente sintéticamente en el colorante mientras que el grupo alquino se incorpora al ADN durante la síntesis de oligonucleótidos. Al mezclar en presencia de  $\text{Cu}^+$  los dos componentes se acoplan rápidamente para formar el triazol, en este caso portando el oligonucleótido como un sustituyente y el colorante como el otro. Otro avance más reciente proporciona el componente alquino dentro de una estructura de anillo tensada. En este caso, la reacción con una azida no requiere el catalizador de cobre, que es impulsado por la liberación de la energía de deformación del anillo a medida que se forma el triazol. Esto se conoce mejor como la reacción clic sin cobre. La orientación para aplicar la química clic a los métodos de la invención se puede encontrar en las siguientes referencias: Rostovtsev VV, Green LG; Fokin, Valery V, Sharpless KB (2002). "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes". *Angewandte Chemie International Edition* 41 (14): 2596-2599. Moses JE y Moorhouse AD (2007). "The growing applications of click chemistry". *Chem Soc. Rev.* 36 (8): 1249-1262.

Cuando se usan dos o más colorantes que se inactivan mutuamente, tales colorantes pueden unirse al ADN usando químicas de unión ortogonal. Por ejemplo, los ésteres de NHS pueden usarse para reaccionar muy específicamente con aminas primarias o las maleimidias reaccionarán con grupos tiol. Los nucleótidos modificados con aminas primarias ( $\text{NH}_2$ ) o tiol ( $\text{SH}$ ) están comercialmente disponibles. Estas modificaciones relativamente pequeñas se incorporan fácilmente en una síntesis de ADN mediada por polimerasa y se pueden usar para reacciones de marcado posteriores usando colorantes modificados con NHS o maleimida. En Hermanson (citado anteriormente) se puede encontrar orientación para seleccionar y usar tales químicas de enlazadores ortogonales.

Se muestran químicas de fijación ortogonales adicionales en las Figuras 3A-3H. La Figura 3A muestra posiciones de unión típicas de fracciones de unión en bases de nucleósidos. La Figura 3B muestra un diagrama de reacción para la cicloadición de tipo Huisgen para una reacción catalizada por cobre y una reacción no catalizada, por ejemplo, divulgada en las referencias citadas anteriormente. La Figura 3C muestra un diagrama de reacción para la cicloadición de alqueno más óxido de nitrilo, por ejemplo, como se describe en Gutmiedl et al., *Org. Lett.*, 11: 2405-2408 (2009). La Figura 3D muestra un diagrama de reacción para la cicloadición de Diels-Alder, por ejemplo, divulgado en Seelig et al., *Tetrahedron Lett.*, 38: 7729-7732 (1997). La Figura 3E muestra un diagrama de reacción para la ligadura de carbonilo, por ejemplo, como se describe en Casi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 134: 5887-5892 (2012); Shao et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 3893-3899 (1995); Rideout, *Science*, 233: 561-563 (1986); o similares. La Figura 3F muestra un diagrama de reacción para la adición de Michael, por ejemplo, divulgado en Brinkley, *Bioconjugate Chemistry*, 3: 2-13 (1992). La Figura 3G muestra un diagrama de reacción para la ligadura química nativa, por ejemplo, divulgado en Schuler et al., *Bioconjugate Chemistry*, 13: 1039-1043 (2002); Dawson et al., *Science*, 266: 776-779 (1994); o similares. La Figura 3H muestra un diagrama de reacción para la formación de amida a través de un éster activo, por ejemplo, divulgado en Hermanson (citado anteriormente). Una molécula de ácido nucleico puede modificarse directamente con N-bromosuccinimida que al reaccionar con el ácido nucleico dará como resultado 5-bromocisteína,

8-bromoadenina y 8-bromoguanina. Los nucleótidos modificados pueden reaccionar adicionalmente con nucleófilos de diamina. El nucleófilo restante se puede hacer reaccionar con un colorante reactivo de amina (por ejemplo, colorante NHS) (Hermanson G. en Bioconjugate Techniques, citado anteriormente).

5 Una combinación de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos en una cadena de ácido nucleico puede intercambiarse con su homólogo marcado. Las diversas combinaciones de nucleótidos marcados pueden secuenciarse en paralelo, por ejemplo, marcando un ácido nucleico o ADN fuente con combinaciones de 2 nucleótidos marcados además de las cuatro muestras marcadas individuales, lo que dará como resultado un total de 10 moléculas de ácido nucleico de muestra marcadas de manera diferente o ADN (G, A, T, C, GA, GT, GC, AT, AC, TC). El patrón de secuencia resultante puede permitir una alineación de secuencia más precisa debido a la superposición de posiciones de nucleótidos en la lectura de secuencia redundante.

10 Un método para secuenciar un polímero, tal como una molécula de ácido nucleico incluye proporcionar una proteína de nanoporos o poros (o un poro sintético) insertada en una membrana o estructura similar a membrana u otro sustrato. La base u otra porción del poro puede modificarse con uno o más marcadores de poros. La base puede referirse al lado trans del poro. Opcionalmente, el lado cis y/o trans del poro se puede modificar con uno o más marcadores de poro. Los polímeros de ácido nucleico para analizar o secuenciar pueden usarse como plantilla para producir una versión marcada del polímero de ácido nucleico, en el que uno de los cuatro nucleótidos o hasta los cuatro nucleótidos en el polímero resultante se reemplaza con el análogo o análogos marcados del nucleótido. Se aplica un campo eléctrico al nanoporo que fuerza al polímero de ácido nucleico marcado a través del nanoporo, mientras que se puede usar una fuente de luz monocromática u otra fuente externa para iluminar el nanoporo, excitando así el marcador de poro. Mientras, después o antes de que los nucleótidos marcados del ácido nucleico pasen a través, salgan o entren en el nanoporo, la energía se transfiere del marcador de poro a un marcador de nucleótido, lo que resulta en la emisión de radiación de menor energía. La radiación del marcador de nucleótidos se detecta luego mediante una configuración de microscopio confocal u otro sistema de detección óptica o sistema de microscopía óptica capaz de detectar moléculas individuales conocidas por personas con habilidades ordinarias en la técnica. Los ejemplos de tales sistemas de detección incluyen, pero no se limitan a, microscopía confocal, microscopía epifluorescente y microscopía fluorescente de reflexión interna total (TIRF). Otros polímeros (por ejemplo, proteínas y polímeros distintos de los ácidos nucleicos) que tienen monómeros marcados también pueden secuenciarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, los marcadores fluorescentes o moléculas de donadores se excitan en un sistema TIRF con una onda evanescente, a veces denominada en el presente documento "excitación de onda evanescente".

15 La energía puede transferirse desde un marcador del donante de poros o nanoporos (por ejemplo, un punto cuántico) a un marcador del aceptor en un polímero (por ejemplo, un ácido nucleico) cuando un marcador del aceptor de un monómero marcado con aceptor (por ejemplo, nucleótido) de un polímero interactúa con el marcador del donante mientras, después o antes de que el monómero marcado sale, entra o pasa a través de un nanoporo. Por ejemplo, el marcador del donante se puede colocar o unir al nanoporo en el lado cis o trans o en la superficie del nanoporo de manera que la interacción o transferencia de energía entre el marcador del donante y el marcador del aceptor no tenga lugar hasta que el monómero marcado salga del nanoporo y entre en la vecindad o proximidad del marcador del donante fuera del canal o abertura del nanoporo. Como resultado, la interacción entre los marcadores, la transferencia de energía del marcador del donante al marcador del receptor, la emisión de energía del marcador del aceptor y/o la medición o detección de una emisión de energía del marcador del aceptor puede tener lugar fuera del pasaje, canal o abertura que atraviesa el nanoporo, por ejemplo, dentro de una cámara cis o trans en los lados cis o trans de un nanoporo. La medición o detección de la energía emitida por el marcador del aceptor de un monómero puede utilizarse para identificar el monómero.

20 La marcador de nanoporos puede colocarse fuera del pasaje, canal o abertura del nanoporo de manera que el marcador pueda ser visible o expuesto para facilitar la excitación o iluminación del marcador. La interacción y la transferencia de energía entre un marcador del donante y un marcador del aceptor y la emisión de energía del marcador del aceptor como resultado de la transferencia de energía pueden tener lugar fuera del pasaje, canal o abertura del nanoporo. Esto puede hacer posible la facilidad y precisión de la detección o medición de energía o emisión de luz del marcador del aceptor, por ejemplo, a través de un dispositivo óptico de detección o medición.

25 Un marcador del donante puede estar unido de varias maneras y/o en varios sitios en un nanoporo. Por ejemplo, un marcador del donante puede estar unido o conectado directa o indirectamente a una porción o unidad del nanoporo. Alternativamente, se puede colocar un marcador del donante adyacente a un nanoporo.

30 Cada monómero marcado con el aceptor (por ejemplo, nucleótido) de un polímero (por ejemplo, ácido nucleico) puede interactuar secuencialmente con un marcador del donante colocado en o al lado o unido directa o indirectamente a la salida de un nanoporo o canal a través del cual el polímero se transloca. La interacción entre los marcadores del donante y del aceptor puede tener lugar fuera del canal o abertura del nanoporo, por ejemplo, después de que el monómero marcado con el aceptor sale del nanoporo o antes de que el monómero entre en el nanoporo. La interacción puede tener lugar dentro o parcialmente dentro del canal o abertura de nanoporos, por ejemplo, mientras el monómero marcado con el aceptor atraviesa, entra o sale del nanoporo.

35 Cuando se marca uno de los cuatro nucleótidos de un ácido nucleico, la señal dependiente del tiempo que surge de

la emisión del marcador de un solo nucleótido se convierte en una secuencia correspondiente a las posiciones del nucleótido marcado en la secuencia de ácido nucleico. Luego, el proceso se repite para cada uno de los cuatro nucleótidos en muestras separadas y las cuatro secuencias parciales se alinean para ensamblar una secuencia completa de ácido nucleico.

- 5 Cuando se analizan secuencias de ácido nucleico (ADN) marcadas con varios colores, la transferencia de energía de una o más marcadores de donantes a cada uno de los cuatro marcadores de aceptores distintos que pueden existir en una molécula de ácido nucleico puede dar como resultado una emisión de luz en cuatro longitudes de onda o colores distintos (cada uno asociado con uno de los cuatro nucleótidos) lo que permite una lectura de secuencia directa.

#### Velocidad de translocación

- 10 Un obstáculo importante asociado con los enfoques de secuenciación basados en nanoporos es la alta velocidad de translocación del ácido nucleico a través de un nanoporo (~500.000 - 1.000.000 de nucleótidos/s) que no permite la lectura directa de la secuencia debido al ancho de banda limitado del equipo de registro. Una forma de ralentizar la translocación de ácido nucleico con dos proteínas de nanoporos diferentes fue mostrada recientemente por Cherf et al., (Nat Biotechnol., 14 de febrero de 2012; 30 (4): 344-8) y Manrao et al., (Nat Biotechnol. 25 de marzo de 2012; 30 (4): 349-53). Ambos grupos usaron una ADN polimerasa para sintetizar una cadena complementaria a partir de una plantilla objetivo que resultó en la translocación gradual de la plantilla de ADN a través del nanoporo. Por lo tanto, la velocidad de síntesis de la polimerasa de ácido nucleico (10-500 nucleótidos/s) determinó la velocidad de translocación del ADN y dado que es aproximadamente 3-4 órdenes de magnitud más lenta que la translocación directa de ácido nucleico, el análisis de nucleótidos individuales se hizo factible. Sin embargo, la translocación asistida por polimerasa requiere una preparación de muestra significativa para generar un sitio de unión para la polimerasa y la síntesis de ácido nucleico debe bloquearse en masa y solo puede comenzar una vez que el complejo de ácido nucleico-polimerasa es capturado por la proteína del nanoporo. Esto da como resultado una configuración bastante compleja que podría impedir la implementación en un entorno comercial. Además, la fluctuación en las reacciones de síntesis de polimerasa, tal como la polimerización estancada, así como la disociación de la polimerasa del ácido nucleico pueden obstaculizar la lectura de la secuencia, lo que resulta en una tasa de error alta y una longitud de lectura reducida, respectivamente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico objetivo se copia enzimáticamente incorporando nucleótidos modificados fluorescentes. En otras realizaciones, se incorporan nucleótidos modificados con grupos reactivos que pueden marcarse en una reacción posterior a la extensión. El ácido nucleico marcado resultante tiene un mayor diámetro nominal que da como resultado en una menor velocidad de translocación cuando se extrae a través de un nanoporo. La tasa de translocación preferida para la secuenciación óptica se encuentra en el intervalo de 1 a 1000 nucleótidos por segundo con un intervalo más preferido de 200-800 nucleótidos por segundo y una tasa de translocación más preferida de 200-600 nucleótidos por segundo.

- Alternativamente, la velocidad de translocación de un polinucleótido, especialmente un polinucleótido de cadena sencilla, puede controlarse empleando un nanoporo dimensionado de manera que los aductos y/o marcadores, por ejemplo, los colorantes orgánicos unidos a las bases inhiben pero no evitan la translocación de polinucleótidos. Se puede seleccionar una velocidad de translocación uniendo marcadores y/o aductos a una densidad predeterminada. Dichos marcadores y/o aductos pueden tener uniones espaciadas regularmente, por ejemplo, cada tercer nucleótido o similar, o pueden tener uniones aleatorias o pseudoaleatorias, por ejemplo, cada C puede estar marcado. En algunas realizaciones, se puede marcar un número seleccionado de nucleótidos diferentes, por ejemplo, cada A y C, o cada A y G, o cada A y T, o cada C, o similar, que da como resultado una velocidad de translocación promedio. Dicha velocidad promedio puede disminuirse uniendo aductos a nucleótidos no marcados. Los aductos incluyen cualquier molécula, generalmente una molécula orgánica, que se puede unir a un nucleótido utilizando químicas convencionales. Por lo general, los aductos tienen un peso molecular en el mismo intervalo que los colorantes orgánicos comunes, por ejemplo, fluoresceína, Cy3 o similares, los aductos pueden o no ser capaces de generar señales, es decir, servir como un marcador. En algunas realizaciones, los aductos y/o marcadores están unidos a bases de nucleótidos. En otras realizaciones, los marcadores y/o aductos pueden estar unidos a enlaces entre nucleósidos en un polinucleótido. En un aspecto, un método para controlar la velocidad de translocación de un polinucleótido de cadena sencilla a través de un nanoporo comprende la etapa de unir aductos al polinucleótido a una densidad, en la que la velocidad de translocación del polinucleótido de cadena sencilla disminuye monótonicamente con un mayor número de aductos unidos, o con la densidad de aductos unidos. En algunas realizaciones, no se marcan todos los tipos de nucleótidos de un polinucleótido. Por ejemplo, se pueden producir cuatro conjuntos diferentes de un polinucleótido en los que los nucleótidos de cada conjunto están marcados con la misma molécula, por ejemplo, un aceptor del colorante orgánico fluorescente, pero en cada conjunto se marcará un tipo diferente de nucleótido. Por lo tanto, en el conjunto 1 solo se pueden marcar las A; en el conjunto 2 solo se pueden marcar las C; en el conjunto 3 solo se pueden marcar las G; y así sucesivamente. Después de dicha marcación, los cuatro conjuntos de polinucleótidos pueden analizarse por separado de acuerdo con la invención y una secuencia de nucleótidos del polinucleótido determinada a partir de los datos generados en los cuatro análisis. En tales realizaciones, y realizaciones similares, por ejemplo, se usan dos marcadores, en los que algunos de los nucleótidos de un polinucleótido no están marcados, la velocidad de translocación a través de un nanoporo se verá afectada por la distribución del marcador a lo largo del polinucleótido. Para evitar tal variabilidad en la velocidad de translocación, en algunas realizaciones, los nucleótidos que no están marcados con un aceptor o donante para generar señales para determinar la secuencia de nucleótidos, pueden modificarse uniendo un aducto que no produce señales que tiene sustancialmente el mismo efecto sobre la velocidad de translocación como los marcadores que producen señales.

El alcance de la presente invención está limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

#### Kits

En la presente invención se describen kits para llevar a cabo los métodos de la invención. En algunos casos, los kits incluyen reactivos para añadir grupos reactivos a los polinucleótidos objetivo. Por ejemplo, se puede obtener un polinucleótido objetivo para el análisis de acuerdo con la invención transcribiendo su complemento de una muestra usando una polimerasa de ácido nucleico en presencia de análogos de nucleósido trifosfato que incluyen grupos reactivos, tales como aminos o tioles. Por lo tanto, en algunos casos, los kits comprenden uno o más análogos de nucleósidos trifosfato con grupos reactivos. Los kits pueden comprender además uno o más marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente con funcionalidades complementarias a los grupos reactivos. Los kits pueden comprender además una polimerasa de ácido nucleico para incorporar nucleósidos trifosfatos en un polinucleótido objetivo. Las polimerasas de ácido nucleico pueden incluir una transcriptasa inversa cuando se usa ARNm para producir polinucleótidos objetivo, o las polimerasas de ácido nucleico pueden incluir una ADN polimerasa cuando se usa ADN genómico para producir polinucleótidos objetivo. Los kits pueden comprender además tampones, cofactores y reactivos similares para llevar a cabo reacciones de polimerasa. Del mismo modo, los kits pueden incluir además tampones y otros componentes de reacción para llevar a cabo reacciones entre grupos reactivos y funcionalidades complementarias en marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente para producir un polinucleótido objetivo marcado. Los kits pueden incluir además membranas de fase sólida y nanoporos de proteínas para ensamblar en una matriz de nanoporos operable. Dichos últimos kits pueden incluir además miembros de donantes de un par de FRET para la unión a nanoporos de proteínas o a una membrana de fase sólida. Los kits pueden incluir matrices de nanoporos ensambladas que comprenden una membrana de fase sólida que incluye nanoporos de proteína incorporados y miembros de donantes de un par de FRET.

#### Definiciones

"FRET" o "Forrester, o fluorescencia, transferencia de energía resonante" significa un mecanismo de transferencia de energía dipolo-dipolo no radiactiva desde un fluoróforo donante a aceptor. La eficiencia de FRET puede depender de la distancia entre el donante y el aceptor, así como las propiedades de los fluoróforos (Stryer, L., Annu Rev Biochem. 47 (1978): 819-846). "Distancia de FRET" significa una distancia entre un donante de FRET y un aceptor de FRET sobre el cual puede tener lugar una interacción de FRET y una señal de FRET detectable producida por el aceptor de FRET.

"Kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para llevar a cabo un método de la invención. En el contexto de los ensayos de reacción, tales sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, marcadores fluorescentes, tales como marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente, agentes de enlace de marcadores fluorescentes, enzimas, etc. en recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más empaques (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción relevantes y/o materiales de apoyo. Dichos contenidos pueden ser suministrados al destinatario previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para usar en un ensayo, mientras que un segundo recipiente o más contienen marcadores fluorescentes que se inactivan mutuamente.

Dispositivo de "microfluidos" o "nanofluidos" significa un sistema integrado de una o más cámaras, puertos y canales que están interconectados y en comunicación fluida y diseñados para llevar a cabo una reacción o proceso analítico, ya sea solo o en cooperación con un aparato o instrumento que proporciona funciones de soporte, tales como introducción de muestras, medios de conducción de fluidos y/o reactivos, control de temperatura, sistemas de detección, recolección de datos y/o sistemas de integración, y similares. Los dispositivos de microfluidos y nanofluidos pueden incluir además válvulas, bombas, filtros y recubrimientos funcionales especializados en paredes interiores, por ejemplo, para evitar la adsorción de los componentes o reactivos de la muestra, facilitar el movimiento de los reactivos por electroosmosis o similares. Tales dispositivos generalmente se fabrican en o como un sustrato sólido, que puede ser vidrio, plástico u otros materiales poliméricos sólidos, y pueden tener un formato plano para facilitar la detección y monitoreo del movimiento de muestras y reactivos, especialmente a través de métodos ópticos o electroquímicos. En algunas realizaciones, dichos dispositivos son desechables después de un solo uso. Las características de un dispositivo de microfluidos generalmente tiene dimensiones de sección transversal de menos de unos pocos cientos de micrómetros cuadrados y los pasajes generalmente tienen dimensiones capilares, por ejemplo, que tiene dimensiones de sección transversal máximas de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ . Los dispositivos de microfluidos suelen tener capacidades de volumen en el intervalo de 1  $\mu\text{L}$  a unos pocos nL, por ejemplo, 10-100 nL. Las dimensiones de las estructuras correspondientes en los dispositivos de nanofluidos son típicamente de 1 a 3 órdenes de magnitud menos que las de los dispositivos de microfluidos. La fabricación y operación de dispositivos de microfluidos y nanofluidos son bien conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las siguientes referencias: Ramsey, patentes de los Estados Unidos Nos. 6,001,229; 5,858,195; 6,010,607; y 6,033,546; Soane et al., patentes de los Estados Unidos Nos. 5,126,022 y 6,054,034; Nelson et al., patente de los Estados Unidos No. 6,613,525; Maher et al., patente de los Estados Unidos No. 6,399,952; Ricco et al., publicación internacional de patente WO 02/24322; Bjornson et al., publicación internacional de patente WO 99/19717; Wilding et al., patentes de los Estados Unidos Nos. 5,587,128; 5,498,392; Sia et al., Electrophoresis, 24: 3563-3576 (2003); Unger et al., Science,

288: 113-116 (2000); Enzelberger et al., patente de los Estados Unidos No. 6.960.437; Cao, "Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications", (Imperial College Press, Londres, 2004).

"Nanoporo" significa cualquier abertura posicionada en un sustrato que permite el paso de analitos a través del sustrato en un orden predeterminado o discernible, o en el caso de analitos poliméricos, el paso de sus unidades monoméricas a través del sustrato en un orden predeterminado o discernible. En el último caso, un orden predeterminado o discernible puede ser la secuencia primaria de unidades monoméricas en el polímero. Los ejemplos de nanoporos incluyen nanoporos de proteína o basados en proteínas, nanoporos sintéticos o de estado sólido, y nanoporos híbridos que comprenden un nanoporo de estado sólido que tiene un nanoporo de proteína incrustada en el mismo. Un nanoporo puede tener un diámetro interno de 1-10 nm o 1-5 nm o 1-3 nm. Los ejemplos de nanoporos de proteína incluyen, pero no se limitan a, hemolisina alfa, porina mitocondrial dependiente de voltaje (VDAC), OmpF, OmpC, MspA y LamB (maltoporina), por ejemplo, divulgado en Rhee, M. et al., Trends in Biotechnology. 25 (4) (2007): 174-181; Bayley et al., (citado anteriormente); Gundlach et al, publicación de patente de los Estados Unidos 2012/0055792; y similares. Se puede emplear cualquier poro de proteína que permita la translocación de moléculas de ácido nucleico individuales. Una proteína de nanoporos puede marcarse en un sitio específico en el exterior del poro, o en un sitio específico en el exterior de una o más unidades de monómero que forman la proteína que forma el poro. Las proteínas de poro se eligen de un grupo de proteínas tales como, pero sin limitarse, hemolisina alfa, MspA, porina mitocondrial dependiente de voltaje (VDAC), porina de ántrax, OmpF, OmpC y LamB (maltoporina). La integración de la proteína del poro en el orificio de estado sólido se logra uniendo un polímero cargado a la proteína del poro. Después de aplicar un campo eléctrico, el complejo cargado se introduce electroforéticamente en el orificio de estado sólido. Se puede crear un nanoporo sintético, o nanoporo de estado sólido, en varias formas de sustratos sólidos, ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitarse a, siliconas (por ejemplo, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>), metales, óxidos metálicos (por ejemplo, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) plásticos, vidrio, material semiconductor y combinaciones de los mismos. Un nanoporo sintético puede ser más estable que un poro de proteína biológico colocado en una membrana de bicapa lipídica. También se puede crear un nanoporo sintético usando un nanotubo de carbono incrustado en un sustrato adecuado, tal como, pero sin limitarse a, epoxi polimerizado. Los nanotubos de carbono pueden tener propiedades químicas y estructurales uniformes y bien definidas. Se pueden obtener nanotubos de carbono de varios tamaños, que van desde uno hasta cientos de nanómetros. Se sabe que la carga superficial de un nanotubo de carbono es aproximadamente cero, y como resultado, el transporte electroforético de un ácido nucleico a través del nanoporo se vuelve simple y predecible (Ito, T. et al., Chem. Commun. 12 (2003): 1482-83). La superficie del sustrato de un nanoporo sintético puede modificarse químicamente para permitir la unión covalente del poro de la proteína o para hacer que las propiedades superficiales sean adecuadas para la secuenciación óptica del nanoporo. Dichas modificaciones de la superficie pueden ser covalentes o no covalentes. La modificación más covalente incluye una deposición de organosilano para la cual se describen los protocolos más comunes: 1) Deposición del alcohol acuoso. Este es el método más fácil para preparar superficies sililadas. Una solución de 95% de etanol-5% de agua se ajusta a pH 4,5-5,5 con ácido acético. Se agrega silano con agitación para producir una concentración final del 2%. Después de la hidrólisis y la formación del grupo silanol, el sustrato se agrega durante 2-5 min. Después de enjuagar sin exceso de materiales sumergiéndolo brevemente en etanol. El curado de la capa de silano es de 5 a 10 minutos a 110 grados Celsius. 2) Deposición de fase de vapor. Los silanos se pueden aplicar a sustratos en condiciones apróticas secas mediante métodos químicos de deposición de vapor. Estos métodos favorecen la deposición en monocapa. En diseños de cámara cerrada, los sustratos se calientan a una temperatura suficiente para alcanzar una presión de vapor de 5 mm. Alternativamente, se puede aplicar vacío hasta que se observe la evaporación de silano. 3) Deposición por centrifugado. Las aplicaciones de centrifugado pueden realizarse bajo condiciones hidrolíticas que favorecen la máxima funcionalización y la deposición de policapas o condiciones secas que favorecen la deposición de monocapa. En algunas realizaciones, se emplean nanoporos individuales con los métodos de la invención. En otras realizaciones, se emplean una pluralidad de nanoporos. En algunas de las últimas realizaciones, se emplea una pluralidad de nanoporos como una matriz de nanoporos, generalmente dispuesta en un sustrato plano, tal como una membrana de fase sólida. Los nanoporos de una matriz de nanoporos pueden espaciarse regularmente, por ejemplo, en un patrón rectilíneo, o pueden espaciarse aleatoriamente. En una realización preferida, los nanoporos están separados regularmente en un patrón rectilíneo en un sustrato plano de fase sólida.

"Péptido", "fragmento de péptido", "polipéptido", "oligopéptido" o "fragmento" en referencia a un péptido se usan como sinónimos en el presente documento y se refieren a un compuesto formado por una única cadena no ramificada de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos en un péptido o polipéptido pueden derivatizarse con diversas fracciones, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, colorantes, biotina, haptenos o fracciones similares. El número de residuos de aminoácidos en un péptido varía ampliamente; sin embargo, preferiblemente, los péptidos u oligopéptidos mencionados en el presente documento usualmente tienen de 2 a 70 residuos de aminoácidos; y más preferiblemente, tienen de 2 a 50 residuos de aminoácidos. Los polipéptidos y fragmentos peptídicos a los que se hace referencia en el presente documento generalmente tienen de unas pocas decenas de residuos de aminoácidos, por ejemplo 20, hasta unos pocos cientos de residuos de aminoácidos, por ejemplo, 200 o más.

"Polímero" significa una pluralidad de monómeros conectados en una cadena lineal.

Usualmente, los polímeros comprenden más de un tipo de monómero, por ejemplo, tal como un polinucleótido que comprende A, C, G y T, o un polipéptido que comprende más de un tipo de aminoácido. Los monómeros pueden incluir, sin limitación, nucleósidos y derivados o análogos de los mismos y aminoácidos y derivados y análogos de los

mismos. En algunas realizaciones, los polímeros son polinucleótidos, por lo que los monómeros de nucleósidos están conectados por enlaces fosfodiéster, o análogos de los mismos.

El "polinucleótido" u "oligonucleótido" se usan indistintamente y cada uno significa un polímero lineal de monómeros de nucleótidos. Siempre que el uso de un oligonucleótido o polinucleótido requiera procesamiento enzimático, tal como la extensión por una polimerasa, la ligadura por una ligasa o similar, un experto en la materia entendería que los oligonucleótidos o polinucleótidos en esos casos no contendrían ciertos análogos de enlaces internucleosídicos, fracciones de azúcar, o bases en cualquiera o algunas posiciones. Los polinucleótidos típicamente varían en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, 5-40, cuando generalmente se denominan "oligonucleótidos", a varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tales como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5' → 3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxiinosina, "U" denota uridina, a menos que se indique lo contrario o sea obvio por el contexto. A menos que se indique lo contrario, las convenciones de terminología y numeración de átomos seguirán las descritas en Strachan y Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, Nueva York, 1999). Generalmente los polinucleótidos comprenden los cuatro nucleósidos naturales (por ejemplo, desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina para ADN o sus equivalentes de ribosa para ARN) unidos por enlaces fosfodiéster; sin embargo, también pueden comprender análogos de nucleótidos no naturales, por ejemplo, incluyendo bases modificadas, azúcares o enlaces internucleosídicos. Está claro para los expertos en la técnica que cuando una enzima tiene requisitos específicos de sustrato de oligonucleótidos o polinucleótidos para la actividad, por ejemplo, el ADN de cadena sencilla, el dúplex de ARN/ADN o similares, entonces la selección de la composición apropiada para los sustratos de oligonucleótidos o polinucleótidos está dentro del conocimiento de un experto en la materia, especialmente con la orientación de tratados, tales como Sambrook et al., Molecular Cloning, Segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989), y referencias similares. Del mismo modo, el oligonucleótido y el polinucleótido pueden referirse a una forma de cadena sencilla o una forma de cadena doble (es decir, dúplex de un oligonucleótido o polinucleótido y su respectivo complemento). Será claro para un experto en la materia qué forma o si ambas formas están destinadas a partir del contexto de los términos de uso.

La "determinación de secuencia", "secuenciación" o "determinación de una secuencia de nucleótidos" o términos similares en referencia a polímeros, tales como polinucleótidos, incluye la determinación de información de secuencia parcial así como completa del polímero. En algunas realizaciones, la determinación de secuencia puede incluir la detección o medición de una característica de identificación, o huella digital, de un polinucleótido, tal como una secuencia única, o sustancialmente única, de señales que está correlacionada con una secuencia de polinucleótido particular. En algunas realizaciones, dicha correlación es una correspondencia uno a uno. En otras realizaciones, tal correlación puede no ser única. En otras realizaciones, dicha correlación permite la identificación de un polinucleótido con una secuencia particular con una probabilidad de más del noventa por ciento; en otras realizaciones, dicha identificación puede hacerse con una probabilidad de más del noventa y nueve por ciento. En el caso de los polinucleótidos, los términos anteriores incluyen la identificación de secuencias de subconjuntos del conjunto completo de cuatro nucleótidos naturales, A, C, G y T, tal como, por ejemplo, una secuencia de solo A y C de un polinucleótido objetivo. Es decir, los términos incluyen la determinación de las identidades, el orden y la ubicación de uno, dos, tres o los cuatro tipos de nucleótidos dentro de un polinucleótido objetivo. En algunas realizaciones, los términos incluyen la determinación de las identidades, el orden y las ubicaciones de dos, tres o los cuatro tipos de nucleótidos dentro de un polinucleótido objetivo. En algunas realizaciones, la determinación de la secuencia se puede lograr identificando el orden y las ubicaciones de un solo tipo de nucleótido, por ejemplo, citosinas, dentro del polinucleótido objetivo "catcgc..." para que su secuencia se represente como un código binario, por ejemplo, "100101..." que representa "c-(no c)(no c)c-(no c)-c..." y similares. En algunas realizaciones, los términos también pueden incluir subsecuencias de un polinucleótido objetivo que sirve como huella digital para el polinucleótido objetivo; es decir, subsecuencias que identifican de forma única un polinucleótido objetivo dentro de un conjunto de polinucleótidos, por ejemplo, todas las diferentes secuencias de ARN expresadas por una célula.

Listado de secuencias

<110> Quantapore, Inc.

50 Huber, Martin

<120> ANÁLISIS DE POLINUCLEÓTIDOS BASADO EN NANOPOROS CON MARCADORES FLUORESCENTES QUE

SE INACTIVAN MUTUAMENTE

<130> 203US00

55 <150> US 62/062.256

<151> 2014-10-10

# ES 2 789 000 T3

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 200

5 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

```
gctatgtggc gcggtattat caagaaggag actgagagga gagtaggagc gagaaggaaa      60
cgagagtgag aggagagtag gagcaagaag gaaacgagag tgagaggaga gtaggagcaa      120
gaaggaaacg agagtgagag gagagtagga gcaagaagga aactgagagg agagtaggag      180
ttactctagc ttcccggcaa                                          200
```

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar una secuencia de nucleótidos de al menos un polinucleótido, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 translocar al menos un polinucleótido de cadena sencilla a través de un nanoporo, en el que los nucleótidos del polinucleótido de cadena sencilla se marcan con marcadores fluorescentes a partir de un conjunto que se inactiva mutuamente, en el que el nanoporo obliga a los marcadores fluorescentes dentro del nanoporo a un estado restringido en el que no se genera prácticamente ninguna señal detectable, y en el que cada marcador fluorescente del conjunto que se inactiva mutuamente (i) inactiva la fluorescencia de cada marcador fluorescente del conjunto de tal manera que los marcadores fluorescentes de nucleótidos adyacentes están en un estado inactivado en solución libre y (ii) genera una señal fluorescente distinta cuando se excita y cuando está en un estado no inactivado;
- 10 excitar el marcador fluorescente de cada nucleótido al salir del nanoporo y antes de la formación de un estado inactivado con un nucleótido adyacente;
- medir una señal fluorescente generada por el marcador fluorescente que sale para identificar el nucleótido al que está unido el marcador fluorescente; y
- 15 determinar una secuencia de nucleótidos del polinucleótido a partir de una secuencia de señales fluorescentes.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los nucleótidos de dicho polinucleótido se marcan con segundos miembros de un par de FRET, cada segundo miembro produce una señal de FRET indicativa del nucleótido al que está unido, y en el que los nucleótidos de dicho polinucleótido pasan en secuencia por un primer miembro del par de FRET colocado adyacente a dicho nanoporo de modo que cada segundo miembro al salir de dicho nanoporo pasa dentro de una distancia de FRET del primer miembro del par de FRET; y
- 20 en el que dicha etapa de excitación incluye exponer el primer miembro a un haz de luz de una primera longitud de onda de manera que FRET ocurra entre el primer y el segundo miembro del par de FRET dentro de la distancia de FRET para generar una señal de FRET de una segunda longitud de onda indicativa del nucleótido que sale de dicho nanoporo.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho nanoporo está dispuesto en una membrana de fase sólida y en el que dicho primer miembro de dicho par de FRET está unido a la membrana de fase sólida adyacente a dicho nanoporo.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho nanoporo es un nanoporo de proteína y en el que dicho primer miembro de dicho par de FRET está unido al nanoporo de proteína.
- 30 5. El método de la reivindicación 2, en el que dicho primer miembro de dicho par de FRET es un donante y dicho segundo miembro de dicho par de FRET es un aceptador.
6. El método de la reivindicación 5 en el que dicho donante es un punto cuántico.
7. El método de la reivindicación 5 en el que dicho aceptador es un colorante orgánico fluorescente.
8. El método de la reivindicación 5, en el que dicha etapa de exposición incluye exponer dicho donante a una onda evanescente de una excitación total reflejada internamente.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, en el que dicho nanoporo se incrusta en una bicapa lipídica.
10. El método de la reivindicación 1 en el que dicho nanoporo está en una matriz de nanoporos que comprende una pluralidad de nanoporos sustancialmente idénticos.
11. El método de la reivindicación 10, en el que dichos nanoporos de dicha matriz de nanoporos son nanoporos de proteínas.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha matriz de nanoporos comprende una membrana de fase sólida que separa una primera cámara de una segunda cámara, comprendiendo la membrana de fase sólida una matriz plana de aberturas, cada una de las cuales tiene dicho nanoporo de proteína inmovilizada allí.

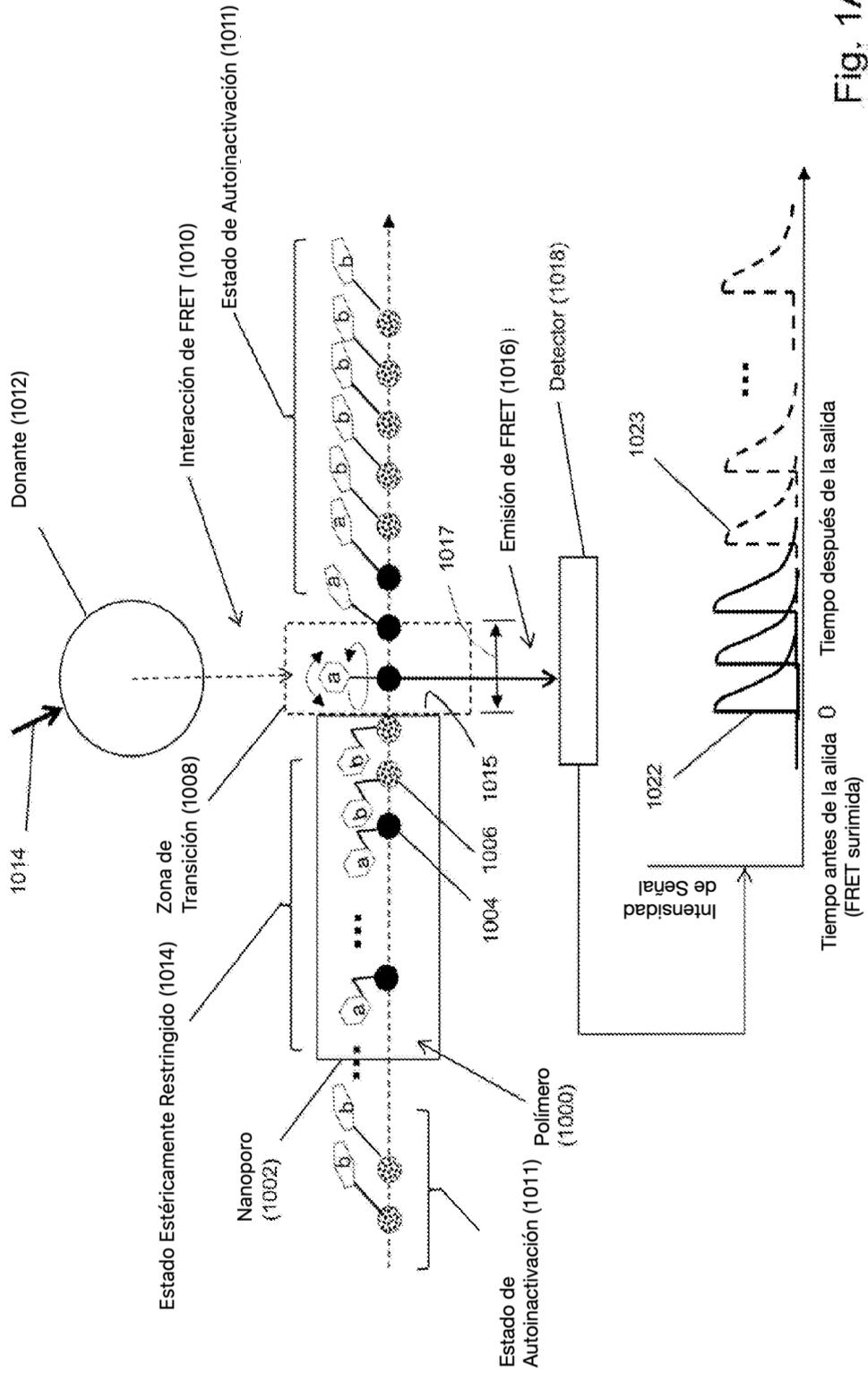


Fig. 1A

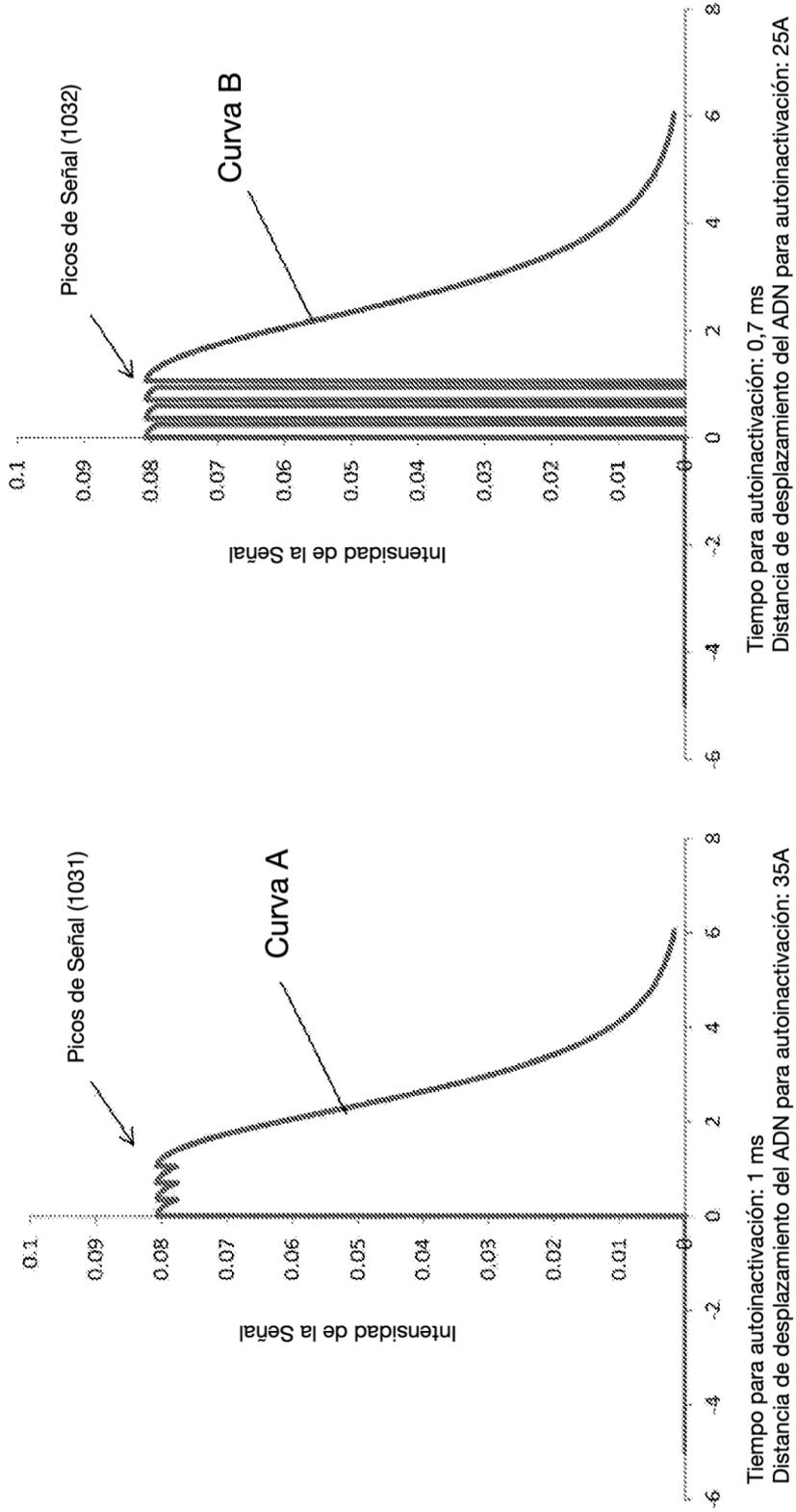
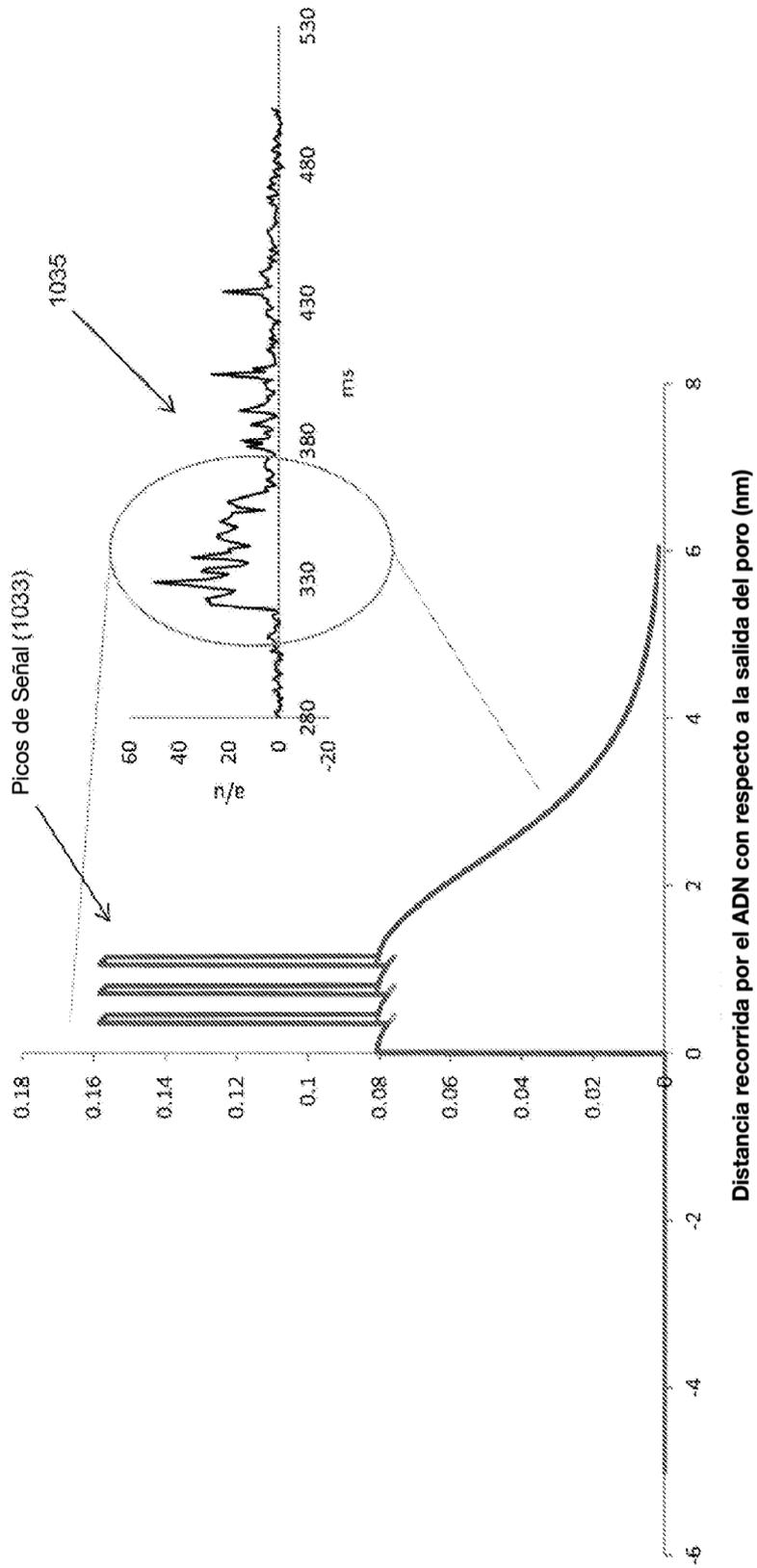


Fig. 1B



Tiempo para autoinactivación: 1,3 ms  
Distancia de desplazamiento del ADN para autoinactivación: 45A

Fig. 1C

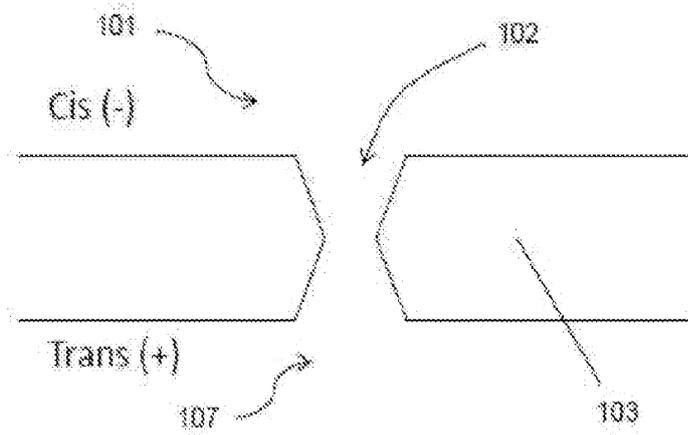


Fig. 2A

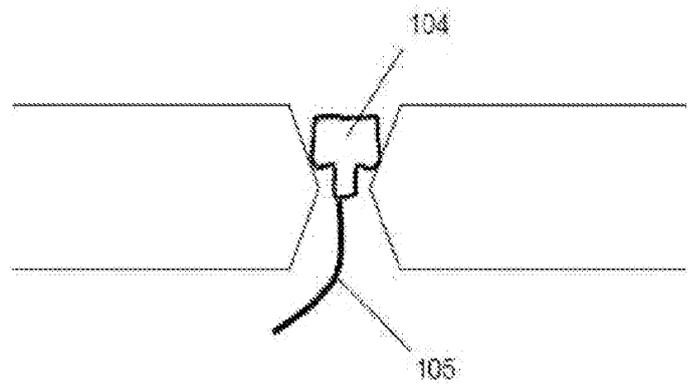


Fig. 2B

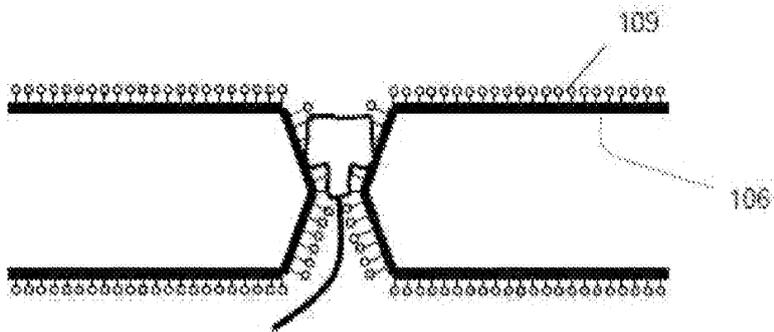
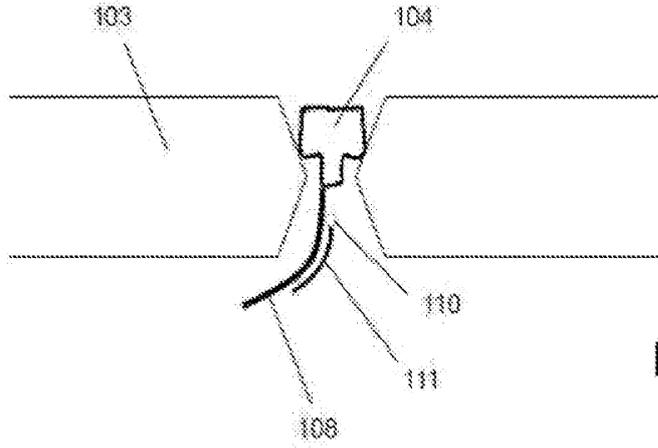
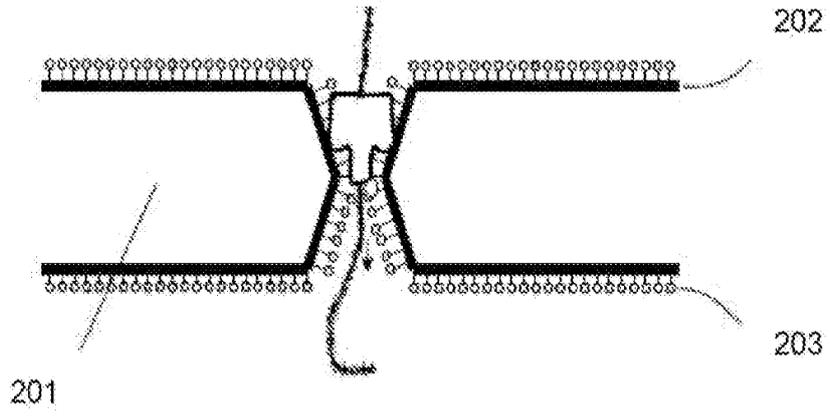


Fig. 2C



**Fig. 2D**



**Fig. 2E**

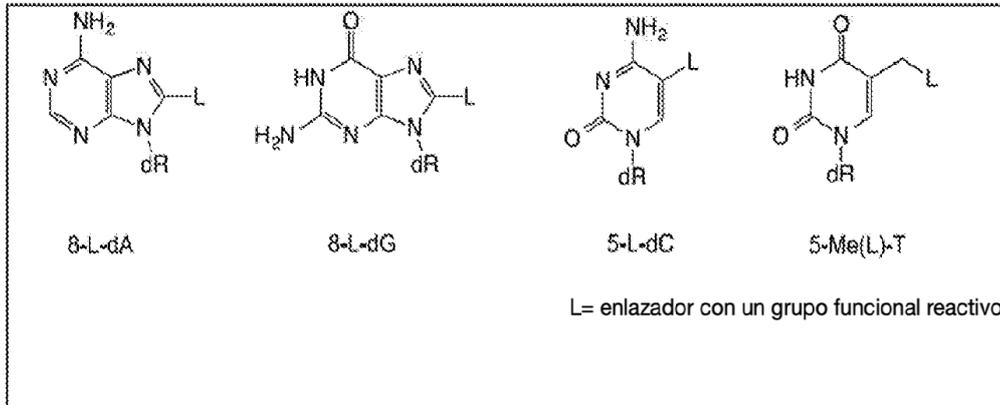
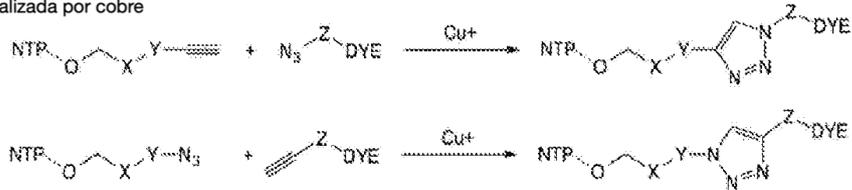


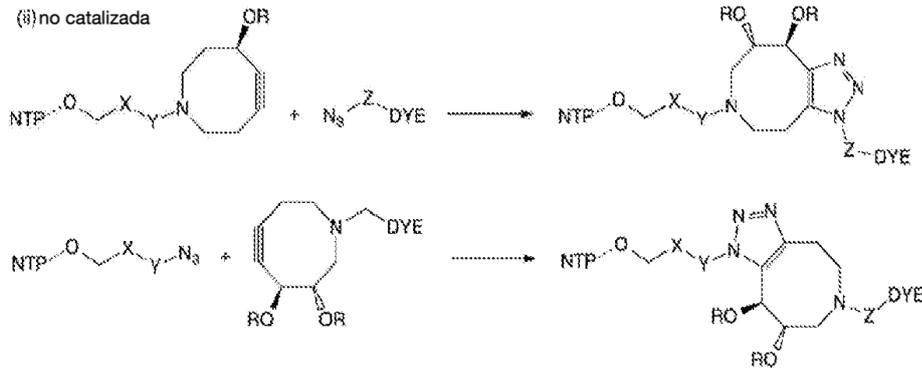
Fig. 3A

cicloaddición tipo Hisgen ("química clic")

(i) catalizada por cobre



(ii) no catalizada



X, Y, Z (independientemente) =  $(CH_2)_n$ ,  $(OCH_2CH_2)_n$ , CHR, CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>,  $(CH_2)_nNHCO(CH_2)_m$ ,  $(CH_2)_nNHCO(CH_2)_m$ , arilo  
 n = 0-10  
 R = alquilo, aralquilo, PEG

Fig. 3B

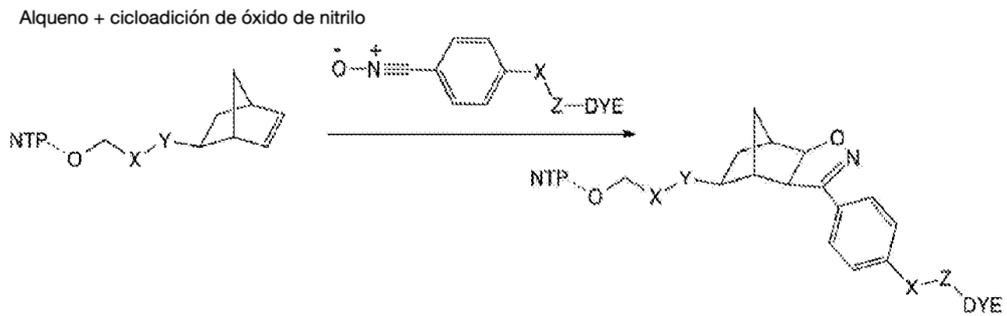


Fig. 3C

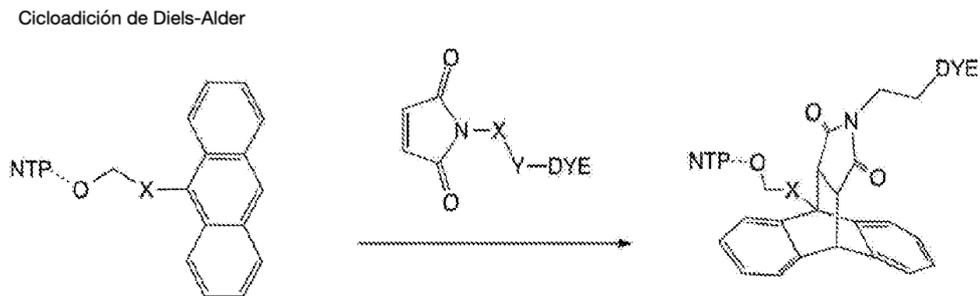


Fig. 3D

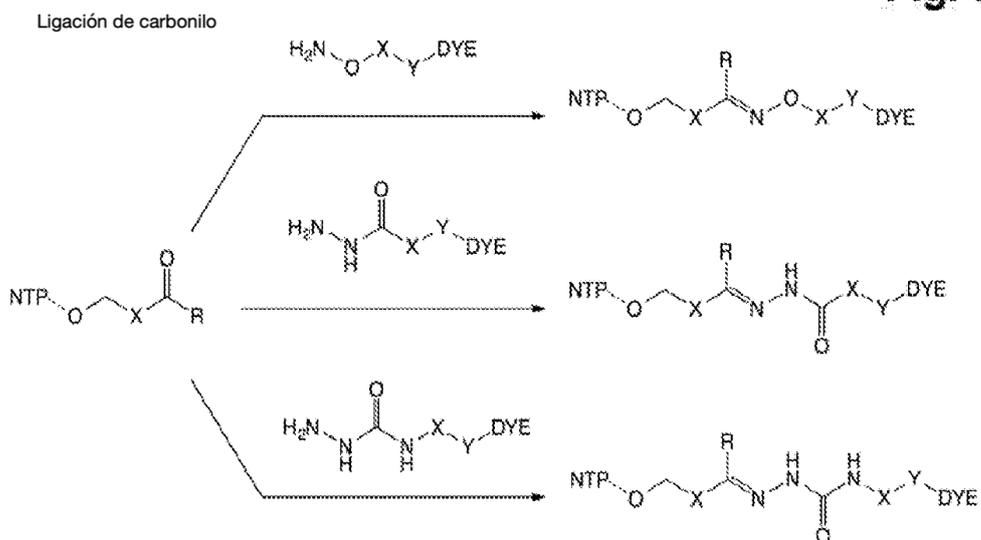


Fig. 3E

Adición de Michael

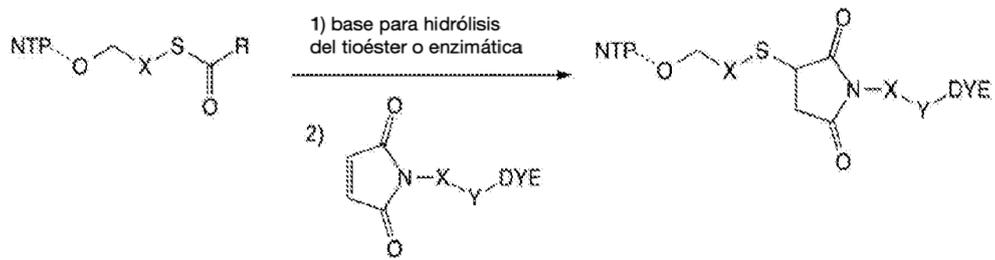


Fig. 3F

Ligación química nativa

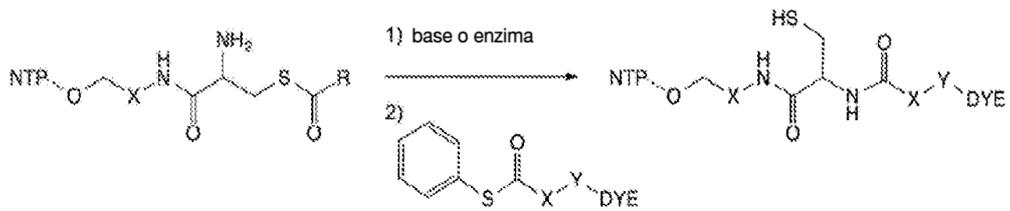


Fig. 3G

Formación de amida a través de éster activo

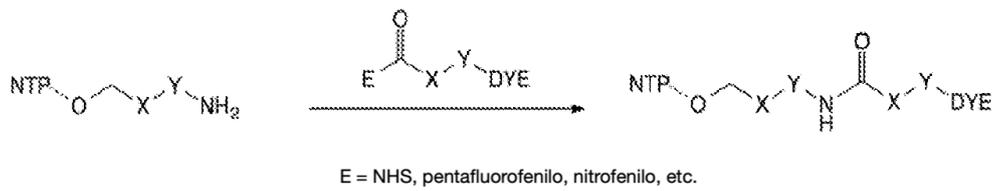


Fig. 3H