

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2017137776, 08.07.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.07.2015 US 62/198,947

(43) Дата публикации заявки: 29.08.2019 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.02.2018(86) Заявка РСТ:
US 2016/041568 (08.07.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/019278 (02.02.2017)

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", С.В. Новоселовой

(71) Заявитель(и):

ИЛЛЮМИНА, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

**ТРЕПАНЬЕ, Элиан Х. (US),
КХУРАНА, Тарун (US)**(54) **ОРТОГОНАЛЬНОЕ ДЕБЛОКИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ**

(57) Формула изобретения

1. Способ секвенирования матриц на основе нуклеиновой кислоты, который включает:

(а) предоставление массива сайтов, в котором каждый сайт включает первую матрицу на основе нуклеиновой кислоты и вторую матрицу на основе нуклеиновой кислоты, где первая матрица на основе нуклеиновой кислоты имеет последовательность, которая отличается от последовательности второй матрицы на основе нуклеиновой кислоты,

где первый праймер связан с первой матрицей на основе нуклеиновой кислоты, и к первому праймеру присоединена обратимо блокирующая группа,

где второй праймер связан со второй матрицей на основе нуклеиновой кислоты, и ко второму праймеру присоединена обратимо блокирующая группа, и

при этом обратимо блокирующая группа, которая присоединена к первому праймеру, отличается от обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко второму праймеру;

(b) селективное удаление обратимо блокирующей группы, которая присоединена к первому праймеру, при одновременном удержании обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко второму праймеру;

(c) достройку первого праймера посредством добавления первого аналога нуклеотида, который присоединен к обратимо блокирующей группе;

(d) селективное удаление обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко

второму праймеру, при одновременном удержании обратимо блокирующей группы, которая присоединена к аналогу нуклеотида, который добавлен к первому праймеру;

(е) достройку второго праймера посредством добавления второго аналога нуклеотида, который присоединен к обратимо блокирующей группе, причем обратимо блокирующая группа, которая присоединена к первому аналогу нуклеотида, отличается от обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко второму аналогу нуклеотида; и

(f) обнаружение аналога нуклеотида, который добавлен к первому праймеру, и аналога нуклеотида, который добавлен ко второму праймеру, на каждом из сайтов, что позволяет определять различные последовательности первой матрицы и второй матрицы на каждом из сайтов.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий:

(g) селективное удаление обратимо блокирующей группы, которая присоединена к первому аналогу нуклеотида, который добавлен к первому праймеру, при одновременном удержании обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко второму аналогу нуклеотида, который добавлен ко второму праймеру;

(h) после проведения этапа (g) достройку первого праймера присоединением третьего аналога нуклеотида, который присоединен к обратимо блокирующей группе;

(i) селективное удаление обратимо блокирующей группы, которая присоединена ко второму аналогу нуклеотида, который добавлен ко второму праймеру, при одновременном удержании обратимо блокирующей группы, которая присоединена к первому аналогу нуклеотида, который добавлен к первому праймеру;

(j) после проведения этапа (i) достройку второго праймера присоединением четвертого аналога нуклеотида, который присоединен к обратимо блокирующей группе, причем обратимо блокирующая группа, которая присоединена к третьему аналогу нуклеотида, отличается от обратимо блокирующей группы, которая присоединена к четвертому аналогу нуклеотида; и

(k) обнаружение аналога нуклеотида, который добавлен к первому праймеру при проведении этапа (h), и аналога нуклеотида, который добавлен ко второму праймеру при проведении этапа (j), на каждом из сайтов, что позволяет определять различные последовательности первой матрицы и второй матрицы на каждом из сайтов.

3. Способ по п. 2, дополнительно включающий повторение этапов (g)-(k).

4. Способ по п. 1 или 2, в котором для обнаружения применяют детектор, пространственное разрешение которого слишком мало для различения точек, находящихся на расстоянии, эквивалентном расстоянию между первым праймером и вторым праймером, находящимися на каждом из сайтов.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором детектор представляет собой оптический детектор.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором аналоги нуклеотидов включают оптические метки.

7. Способ по п. 6, в котором первый аналог нуклеотида взят из первого набора аналогов нуклеотидов, второй аналог нуклеотида взят из второго набора аналогов нуклеотидов, и в котором оптические метки первого набора аналогов нуклеотидов отличаются от оптических меток второго набора аналогов нуклеотидов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором первый аналог нуклеотида взят из первого набора аналогов нуклеотидов, второй аналог нуклеотида взят из второго набора аналогов нуклеотидов, и при этом аналоги нуклеотидов из субнабора, находящегося в первом наборе аналогов нуклеотидов, включают оптические метки.

9. Способ по п. 8, в котором аналоги нуклеотидов из субнабора, находящегося во втором наборе аналогов нуклеотидов, включают оптические метки.

10. Способ по п. 9, в котором аналоги нуклеотидов из субнабора, находящегося в первом наборе аналогов нуклеотидов, включают оптические метки, которые отличаются от оптических меток субнабора нуклеотидов, находящегося во втором наборе аналогов нуклеотидов.

11. Способ по любому из пп. 1-7, в котором первый аналог нуклеотида взят из первого набора аналогов нуклеотидов, второй аналог нуклеотида взят из второго набора аналогов нуклеотидов, и при этом аналоги нуклеотидов из первого набора включают только один тип оптической метки, которую определяют при проведении этапа (f), а аналоги нуклеотидов из второго набора включают только один тип оптической метки, которую определяют при проведении этапа (f).

12. Способ по п. 11, в котором один тип оптической метки присоединен к по существу всем аналогам нуклеотидов первого вида, находящимся в первом наборе,

один тип оптической метки присоединен к субнабору аналогов нуклеотидов второго вида, находящихся в первом наборе,

по существу все аналоги нуклеотидов третьего вида, находящиеся в первом наборе, присоединены к лиганду, и

по существу все аналоги нуклеотидов четвертого вида, находящиеся в первом наборе не присоединены к одному типу оптической метки или к лиганду.

13. Способ по любому из пп. 1-7, в котором первый аналог нуклеотида взят из первого набора аналогов нуклеотидов, второй аналог нуклеотида взят из второго набора аналогов нуклеотидов, причем аналоги нуклеотидов из первого набора включают только два типа оптических меток, определение которых производят при проведении этапа (f), а аналоги нуклеотидов из второго набора включают только два типа оптических меток, определение которых производят при проведении этапа (f).

14. Способ по п. 13, в котором только одна из двух типов оптических меток присоединена к по существу всем аналогам нуклеотидов первого вида, находящимся в первом наборе,

только вторая из двух типов оптических меток присоединена к по существу всем аналогам нуклеотидов второго вида, находящимся в первом наборе,

одна из двух типов оптических меток и вторая из двух типов оптических меток присоединены к аналогам нуклеотидов третьего вида, находящимся в первом наборе, и

по существу все аналоги нуклеотидов четвертого вида, находящиеся в первом наборе, не присоединены ни к одной из двух типов оптических меток, ни ко второй из двух типов оптических меток.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором пиксель детектора одновременно принимает сигналы как от первого праймера, так и от второго праймера.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере один фрагмент основания, который относится к такому же виду частиц, что и фрагмент основания, имеющийся во второй матрице на основе нуклеиновой кислоты.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором этапы (b) и (d) выполняют одновременно.

18. Способ по любому из пп. 1-16, в котором этапы (b) и (d) выполняют последовательно.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором этапы (c) и (e) выполняют одновременно.

20. Способ по любому из пунктов 1-18, в котором этапы (c) и (e) выполняют последовательно.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором одна молекула нуклеиновой кислоты содержит первую матрицу на основе нуклеиновой кислоты и вторую матрицу на основе нуклеиновой кислоты.

22. Способ по любому из пп. 1-20, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты и вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты находятся в разных молекулах нуклеиновых кислот.
23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором площади сайтов составляют 100 мкм^2 или менее.
24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором сайты включают множество ампликонов первой матрицы на основе нуклеиновой кислоты и множество ампликонов второй матрицы на основе нуклеиновой кислоты.
25. Способ по п. 24, в котором множество ампликонов включает кластер нуклеиновой кислоты.
26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором множество сайтов имеет шаг, составляющий 10 мкм или менее.
27. Способ по любому из пп. 1-26, в котором множество сайтов включает по меньшей мере 1×10^6 сайтов.
28. Способ по любому из пп. 1-27, в котором каждый из сайтов включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая уникальна по сравнению с последовательностями нуклеиновых кислот на других сайтах множества.
29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором первый праймер включает первую универсальную последовательность праймера, а первая матрица на основе нуклеиновой кислоты на каждом из сайтов множества сайтов включает первую универсальную последовательность связывания праймера, которая комплементарна первой универсальной последовательности праймера.
30. Способ по п. 29, в котором второй праймер включает вторую универсальную последовательность праймера, а вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты на каждом сайте множества сайтов включает вторую универсальную последовательность связывания праймера, которая комплементарна второй универсальной последовательности праймера, причем первая универсальная последовательность связывания праймера отличается от второй универсальной последовательности связывания праймера.
31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором для выполнения этапов (с) и (е) применяют одну и ту же полимеразу или один и тот же вид полимеразы.
32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором в качестве обратимо блокирующих групп применяют азидометильную и трет-бутоксигруппу.
33. Способ по п. 32, в котором азидометильную группу селективно удаляют обработкой фосфином, а трет-бутоксигруппу селективно удаляют обработкой кислотой.
34. Способ по любому из пп. 1-31, в котором селективное удаление обратимо блокирующих групп включает химическую обработку, тепловую обработку, облучение или электрическую обработку.
35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором обратимо блокирующая группа, которая присоединена к первому праймеру, представляет собой такую же обратимо блокирующую группу, которая присоединена к первому аналогу нуклеотида.
36. Способ по п. 35, в котором обратимо блокирующая группа, которая присоединена ко второму праймеру, представляет собой такую же обратимо блокирующую группу, которая присоединена ко второму аналогу нуклеотида.
37. Способ секвенирования матриц на основе нуклеиновой кислоты, который включает:
- (а) предоставление массива сайтов, в котором каждый сайт включает смесь по меньшей мере двух различных матриц на основе нуклеиновой кислоты;

(b) достройку праймеров, гибризованных с различными матрицами на основе нуклеиновой кислоты на каждом из сайтов различными аналогами нуклеотидов, которые включают различные обратимо блокирующие группы, соответственно, что приводит к образованию различных продуктов достройки праймера, находящихся на каждом из сайтов;

(c) обнаружение различных продуктов достройки праймера для распознавания различных аналогов нуклеотидов, находящихся на каждом сайте;

(d) удаление различных обратимо блокирующих групп с продуктов достройки праймера, находящихся на каждом из сайтов, с помощью первой обработки, которая селективна по отношению к первому виду различных обратимо блокирующих групп, и второй обработки, которая селективна по отношению ко второму виду различных обратимо блокирующих групп; и

(e) повторение этапов (b)-(d) с целью определения последовательности различных аналогов нуклеотидов, присоединенных к каждому из различных продуктов достройки, находящихся на каждом из сайтов.

38. Способ по п. 37, в котором праймеры, которые гибризованы с различными матрицами на основе нуклеиновых кислот, одновременно присутствуют при проведении достройки этапа (b).

39. Способ по любому из пп. 37-38, в котором различные продукты достройки праймера присутствуют одновременно при проведении обнаружения на этапе (c).

40. Способ по любому из пп. 37-39, в котором первая из различных обратимо блокирующих групп и вторая из различных обратимо блокирующих групп присутствуют одновременно на продуктах достройки праймера при проведении удаления на этапе (d).

41. Способ по п. 37, в котором первый из праймеров, который гибризован с первой из различных матриц на основе нуклеиновой кислоты, удаляют из массива сайтов перед проведением достройки второго из праймеров, который гибризован со второй из различных матриц на основе нуклеиновой кислоты.

42. Способ по п. 37, в котором первый продукт из различных продуктов достройки праймера удаляют из массива сайтов перед проведением обнаружения второго продукта из различных продуктов достройки праймера.

43. Способ по п. 37, в котором первый из различных продуктов достройки праймера удаляют из массива сайтов перед проведением второй обработки.

44. Способ по любому из пп. 37-43, в котором этап (c) выполняют после проведения этапа (d).

45. Способ по любому из пп. 37-44, в котором для обнаружения применяют детектор, пространственное разрешение которого слишком мало для различения точек, находящихся на расстоянии, эквивалентном расстоянию между различными продуктами достройки праймера, находящимися на каждом из сайтов.

46. Способ по любому из пп. 37-45, в котором детектор представляет собой оптический детектор.

47. Способ по любому из пп. 37-46, в котором аналоги нуклеотидов включают оптические метки.

48. Способ по любому из пп. 37-47, в котором первый набор аналогов нуклеотидов добавлен к первому продукту из различных продуктов достройки праймера, а второй набор аналогов нуклеотидов добавлен ко второму продукту из различных продуктов достройки праймера, причем аналоги нуклеотидов из первого набора включают оптические метки, которые отличаются от оптических меток второго набора аналогов нуклеотидов.

49. Способ по любому из пп. 37-48, в котором пиксель детектора одновременно

принимает сигналы как от первого продукта достройки праймера, так и от второго продукта достройки праймера.

50. Способ по любому из пп. 37-49, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты включает по меньшей мере один фрагмент основания, который относится к такому же виду частиц, что и фрагмент основания, имеющийся во второй матрице на основе нуклеиновой кислоты.

51. Способ по любому из пп. 37-50, в котором одна молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере две различные матрицы на основе нуклеиновой кислоты.

52. Способ по любому из пп. 37-50, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты и вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты по меньшей мере двух различных матриц на основе нуклеиновой кислоты находятся в разных молекулах нуклеиновых кислот.

53. Способ по любому из пп. 37-52, в котором площади сайтов составляют 100 мкм^2 или менее.

54. Способ по любому из пп. 37-53, в котором сайты включают множество ампликонов каждой из по меньшей мере двух различных матриц на основе нуклеиновой кислоты.

55. Способ по п. 54, в котором множество ампликонов включает кластер нуклеиновой кислоты.

56. Способ по любому из пп. 37-55, в котором множество сайтов имеет шаг, составляющий 10 мкм или менее.

57. Способ по любому из пп. 37-56, в котором множество сайтов включает по меньшей мере 1×10^6 сайтов.

58. Способ по любому из пп. 37-57, в котором каждый из сайтов включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая уникальна по сравнению с последовательностями нуклеиновых кислот на других сайтах множества.

59. Способ по любому из пп. 37-58, в котором одна и та же полимеразы или один и тот же вид полимеразы выполняет на каждом из сайтов достройку праймеров, гибридизованных с различными матрицами на основе нуклеиновой кислоты.

60. Способ по любому из пп. 37-59, в котором селективные обработки включают селективное удаление обратимо блокирующей группы, которое включает удаление азидометильной группы с помощью обработки фосфином, и селективное удаление обратимо блокирующей группы, которое включает удаление трет-бутоксигруппы с помощью обработки кислотой.

61. Способ по любому из пп. 37-59, в котором селективное удаление обратимо блокирующих групп включает химическую обработку, тепловую обработку, облучение или электрическую обработку.

62. Массив нуклеиновых кислот, включающий:

множество сайтов на твердой подложке, в котором каждый сайт включает первую матрицу на основе нуклеиновой кислоты и вторую матрицу на основе нуклеиновой кислоты,

где первая матрица на основе нуклеиновой кислоты имеет последовательность, которая отличается от последовательности второй матрицы на основе нуклеиновой кислоты,

где первый праймер связан с первой матрицей на основе нуклеиновой кислоты, и к первому праймеру присоединена первая обратимо блокирующая группа,

где второй праймер связан со второй матрицей на основе нуклеиновой кислоты, ко второму праймеру присоединена вторая обратимо блокирующая группа, и

при этом первая обратимо блокирующая группа отличается от второй обратимо

блокирующей группы.

63. Массив нуклеиновых кислот по п. 62, в котором каждый сайт занимает на твердой подложке площадь, составляющую 100 мкм^2 или менее.

64. Массив нуклеиновых кислот по п. 62 или 63, в котором множество сайтов имеет шаг, составляющий 10 мкм или менее.

65. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-64, в котором множество сайтов включает по меньшей мере 1×10^6 сайтов.

66. Массив нуклеиновых кислот по п. 65, в котором каждый из сайтов включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая уникальна по сравнению с последовательностями нуклеиновых кислот на других сайтах множества.

67. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-66, в котором первая обратимо блокирующая группа присоединена к 3'-нуклеотиду первого праймера.

68. Массив нуклеиновых кислот по п. 67, в котором 3'-нуклеотид первого праймера присоединен к первой оптической метке.

69. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 67-68, в котором вторая обратимо блокирующая группа присоединена к 3'-нуклеотиду второго праймера.

70. Массив нуклеиновых кислот по п. 69, в котором 3'-нуклеотид второго праймера присоединен ко второй оптической метке, и вторая оптическая метка оптически отличается от первой оптической метки.

71. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 67-70, в котором первая и вторая оптические метки включают флуорофоры.

72. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-71, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты и вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты включают ДНК.

73. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-72, в котором одна молекула нуклеиновой кислоты содержит первую матрицу на основе нуклеиновой кислоты и вторую матрицу на основе нуклеиновой кислоты.

74. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-73, в котором первая матрица на основе нуклеиновой кислоты и вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты находятся в разных молекулах нуклеиновых кислот.

75. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-74, в котором сайты включают множество ампликонов первой матрицы на основе нуклеиновой кислоты и множество ампликонов второй матрицы на основе нуклеиновой кислоты.

76. Массив нуклеиновых кислот по п. 75, в котором множество ампликонов включает кластер нуклеиновой кислоты.

77. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-76, в котором первый праймер включает первую универсальную последовательность праймера, а первая матрица на основе нуклеиновой кислоты на каждом из сайтов множества сайтов включает первую универсальную последовательность связывания праймера, которая комплементарна первой универсальной последовательности праймера.

78. Массив нуклеиновых кислот по п. 77, в котором второй праймер включает вторую универсальную последовательность праймера, а вторая матрица на основе нуклеиновой кислоты на каждом сайте множества сайтов включает вторую универсальную последовательность связывания праймера, которая комплементарна второй универсальной последовательности праймера, и при этом первая универсальная последовательность связывания праймера отличается от второй универсальной последовательности связывания праймера.

79. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-78, в котором первая полимеразы связана с первым праймером и первой матрицей на основе нуклеиновой кислоты.

80. Массив нуклеиновых кислот по п. 79, в котором вторая полимераза связана со вторым праймером и второй матрицей на основе нуклеиновой кислоты, и при этом первая полимераза и вторая полимераза относятся к одному виду полимеразы.

81. Массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-80, в котором первая обратимо блокирующая группа включает азидометильную группу, а вторая обратимо блокирующая группа включает трет-бутокси-этоксигруппу.

82. Установка для обнаружения, включающая:

массив нуклеиновых кислот по любому из пп. 62-81, и

детектор, установленный для обнаружения множества сайтов.

83. Установка для обнаружения по п. 82, в которой пространственное разрешение детектора слишком мало для разрешения точек на расстоянии, эквивалентном расстоянию между первым праймером и вторым праймером на каждом из сайтов.

84. Установка для обнаружения по п. 82 или 83, в которой детектор представляет собой оптический детектор.

85. Установка для обнаружения по любому из пп. 82-83, в которой пиксель детектора предназначен для одновременного приема сигналов от первого праймера и от второго праймера.