



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 183 394**

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98935212.5**

⑧⑥ Fecha de presentación: **24.07.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1 017 848**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2000**

⑤④ Título: **Análisis de la secuencia de ácidos nucleicos.**

③⑩ Prioridad: **28.07.1997 GB 9715942**
22.12.1997 GB 9727103

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.03.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.03.2003

⑦③ Titular/es: **Medical Biosystems Ltd.**
The Old Mill, Beaston Cross, Broadhempston
Nr. Totnes, Devon TQ9 6BX, GB

⑦② Inventor/es: **Densham, Daniel Henry**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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).

DESCRIPCION

Análisis de la secuencia de ácidos nucleicos.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la secuencia de un polinucleótido.

10 **Antecedentes de la invención**

La capacidad de determinar la secuencia de un polinucleótido es de gran importancia científica. Por ejemplo, el Proyecto del Genoma Humano es un ambicioso esfuerzo internacional para trazar el mapa y la secuencia de los tres billones de bases de DNA codificadas en el genoma humano. Cuando se complete, la base de datos de la secuencia resultante será una herramienta de poder sin precedentes para la investigación biomédica. El principal obstáculo para una conclusión con éxito de este proyecto tiene que ver con la tecnología usada en el procedimiento de secuenciación.

El procedimiento principal de uso general para la secuenciación del DNA a gran escala es el procedimiento de terminación de cadena. Este procedimiento se desarrolló primero por Sanger y Coulson (Sanger y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74: 5463-5467), y se basa en el uso de derivados didesoxi de los cuatro trifosfatos de nucleósidos que se incorporan a la cadena polinucleotídica naciente en la reacción de la polimerasa. Tras la incorporación, los derivados didesoxi terminan la reacción de la polimerasa y seguidamente los productos se separan por electroforesis en gel y se analizan para revelar la posición en la que el derivado didesoxi particular se ha incorporado en la cadena.

Aunque este procedimiento se usa ampliamente y produce resultados fiables, se reconoce que es lento, laborioso y caro.

Un procedimiento de secuenciación alternativo se propone en el documento EP-A-0471732, que utiliza medios espectroscópicos para detectar la incorporación de un nucleótido en la cadena polinucleotídica naciente complementaria al molde. El procedimiento se basa en un complejo inmovilizado de molde y cebador, que se expone a un flujo que contiene solamente uno de los diferentes nucleótidos. Las técnicas espectroscópicas se usan después para medir una señal dependiente del tiempo que se origina del crecimiento de la copia del molde catalizado por la polimerasa. Las técnicas espectroscópicas descritas son espectroscopía de resonancia del plasmón superficial (SPR), que mide los cambios en un analito dentro de un campo de ondas evanescentes, y técnicas de medida de fluorescencia. Sin embargo, se reconoce que este procedimiento tiene limitaciones; lo más grave de la técnica SPR es que, a medida que el tamaño de la cadena copiada crece, el tamaño absoluto de la señal también crece debido al movimiento de la cadena fuera del campo de ondas evanescentes, haciendo más difícil detectar los incrementos. Las técnicas de medida de fluorescencia tienen la desventaja de aumentar la interferencia de fondo de los fluoróforos incorporados en el crecimiento de la cadena polinucleotídica naciente. A medida que la cadena crece, el "ruido" de fondo aumenta y el tiempo requerido para detectar cada incorporación de nucleótidos necesita incrementarse. Esto restringe gravemente el uso del procedimiento para secuenciar polinucleótidos grandes.

Por lo tanto, es necesario un procedimiento mejorado para la determinación de la secuencia de polinucleótidos que incremente significativamente la velocidad a la que un polinucleótido se secuencia y que se lleve a cabo preferiblemente por un proceso automatizado, reduciendo la complejidad y el coste asociados con los procedimientos existentes.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en la verificación de que la medida de una radiación electromagnética u otra puede utilizarse para detectar un cambio de masa y/o de conformación en una enzima polimerasa, el cual se produce cuando un nucleótido se incorpora a la cadena de polinucleotídica naciente.

Según la presente invención, un procedimiento para la secuenciación de un polinucleótido comprende las etapas de:

- 60 (i) hacer reaccionar un polinucleótido molde con una enzima polimerasa inmovilizada en un soporte sólido, y los diferentes nucleótidos, en condiciones suficientes para la reacción de la polimerasa; y
(ii) detectar la incorporación de un nucleótido complementario al polinucleótido objetivo, midiendo la

radiación.

La radiación puede aplicarse a una muestra utilizando un número de técnicas, incluyendo las técnicas de detección sensible en superficiales, donde un cambio en la respuesta óptica en una superficie óptica sólida se utiliza para indicar una interacción de unión en la superficie. En una realización preferida de la invención; se usa la técnica de espectroscopía de ondas evanescentes, en particular la espectroscopía de resonancia del plasmón superficial (SPR).

En una realización de la invención, los nucleótidos utilizados en el procedimiento incluyen un grupo bloqueante en la posición 3', y opcionalmente en la posición 5', el cual evita la incorporación de los nucleótidos en la cadena polinucleotídica. Sin embargo, los grupos bloqueantes pueden eliminarse selectivamente para permitir que suceda la incorporación. Utilizando los nucleótidos bloqueantes, es posible llevar a cabo el procedimiento usando todos los nucleótidos presentes en la reacción en un momento dado. La eliminación selectiva de los grupos bloqueantes se lleva a cabo de forma que asegure la detección de cada nucleótido incorporado. Por lo tanto el procedimiento puede proceder en "tiempo real", para lograr una alta velocidad de análisis de la secuencia.

Descripción de los dibujos

La invención se describirá a modo de ejemplo solamente con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La Figura 1 es una ilustración esquemática de un análisis de secuencia polinucleotídica utilizando la espectroscopía SPR; y

La Figura 2 ilustra las diferentes señales de respuesta detectadas para la polimerización de cada uno de los diferentes nucleótidos.

La Figura 3 ilustra el procedimiento de síntesis de los nucleótidos doblemente bloqueados.

Descripción de la invención

El presente procedimiento para secuenciar un polinucleótido implica el análisis de la interacción cinética entre una enzima polimerasa, un polinucleótido diana y un nucleótido complementario. La medida de la interacción cinética se lleva a cabo controlando los cambios de absorción de la radiación electromagnética u otra que ocurren si la reacción continúa.

El término "polinucleótido" como aquí se usa se ha a interpretar ampliamente, e incluye DNA y RNA, incluyendo DNA y RNA modificados, así como otras moléculas similares de ácidos nucleicos que hibridan, por ejemplo ácido péptido nucleico (PNA).

Típicamente, el procedimiento se lleva a cabo aplicando radiación electromagnética, utilizando las técnicas de resonancia del plasmón superficial o resonancia magnética nuclear. Sin embargo, pueden considerarse otras técnicas que miden cambios en la radiación, por ejemplo espectroscopía de fluorescencia reflectante interna total (TIRF), reflexión total atenuada (ATR), reflexión total frustrada (FTR), reflectometría angular de Brewster, reflexión interna total dispersa (STIR) o elipsometría de ondas evanescentes.

También se prevén otras técnicas distintas de aquellas que requieren radiación eletromagnética, en particular técnicas fotoquímicas tal como la quimioluminiscencia, y técnicas gravimétricas que incluyen sistemas de resonancia tales como las técnicas de ondas acústicas superficiales (SAW) y técnicas de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

La espectroscopía de resonancia del plasmón de superficie (SPR) es un procedimiento preferido, y mide las propiedades de una solución detectando las diferencias del índice de refracción entre la fase masal de la solución y la región de ondas evanescentes. La luz monocromática incidente se refleja en un ángulo específico fuera de una superficie óptica sólida (chip sensor) en el lado opuesto a la muestra en estudio. La luz se extiende hacia dentro de la muestra en una distancia muy corta y está afectada por una interacción en la superficie.

Los chips sensores adecuados se conocen en la técnica. Típicamente, comprenden un material ópticamente transparente, por ejemplo vidrio, y una película delgada reflectante, por ejemplo plata u oro. Para una revisión de la espectroscopía SPR véase la Publicación de patente europea N°. 0648328

(la descripción de la cual se incorpora en su totalidad aquí como referencia).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) es otro procedimiento preferido, y mide las propiedades magnéticas de los compuestos. Los núcleos de los compuestos se orientan energéticamente por una combinación del campo magnético aplicado y una radiación de radiofrecuencia. Cuando la energía ejercida sobre un núcleo iguala a la diferencia de energía entre los estados de rotación (la diferencia entre la orientación paralela o antiparalela a la dirección de los campos aplicados), se logra un estado conocido como resonancia. La absorción y emisión posterior de energía asociadas con el cambio de un estado de rotación a otro, se detecta mediante un receptor de radiofrecuencia.

Un aspecto importante del procedimiento de la presente invención es el uso de una enzima polimerasa inmovilizada en un soporte sólido. La inmovilización de la polimerasa ofrece varias ventajas importantes para el éxito de este procedimiento. Primeramente, se reduce considerablemente el problema de "ruido" aleatorio asociado a la medida de la absorción de energía en las moléculas solubles. En segundo lugar, se reduce el problema del ruido de la interacción de cualquier sustrato (por ejemplo nucleótidos) no relacionado directamente con la polimerasa, ya que la polimerasa puede mantenerse dentro de un área definida específicamente respecto al campo de medida. Esto es de particular relevancia si la técnica utilizada para medir los cambios en radiación requiere la medida de la fluorescencia, como en la TIRF, en la que la fluorescencia de fondo se incrementa a medida que crece la cadena naciente. También, si se utiliza la espectroscopía SPR, las reacciones de la polimerasa se mantienen dentro del campo de ondas evanescentes y así se pueden hacer medidas exactas pueden realizarse sin tener en cuenta el tamaño del polinucleótido. Finalmente, como ni el polinucleótido diana ni el oligonucleótido cebador se unen irreversiblemente a la superficie sólida, es relativamente sencillo regenerar la superficie, para permitir reacciones de secuenciación adicionales que tienen lugar utilizando la misma polimerasa inmovilizada.

La inmovilización se puede realizar utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. En particular, se puede utilizar la inmovilización que usa procedimientos estándar de acoplamiento de aminas, con la unión de aminas asociadas a ligando, por ejemplo, una superficie activada por un éster de dextrano o N-hidroxisuccinimida. En una realización preferida de la invención, la polimerasa se inmoviliza en la superficie de un chip sensor de SPR que mantiene la polimerasa en estrecha proximidad a la superficie del sensor en que se pueden medir los cambios del índice de refracción. Se describen ejemplos de los procedimientos utilizados para inmovilizar biomoléculas en sensores ópticos en el documento EP-A-0589867, y en Löfås y col., Biosens. Bioelectron. (1995) 10: 813-822.

La polimerasa utilizada en la invención puede ser de cualquier tipo conocido. Por ejemplo, la polimerasa puede ser cualquier polimerasa de DNA dependiente de DNA. Si el polinucleótido diana es una molécula de RNA, entonces la polimerasa puede ser una polimerasa de DNA dependiente de RNA, es decir transcriptasa inversa, o una polimerasa de RNA dependiente de RNA, es decir replicasa de RNA. En una realización preferida de la invención, la polimerasa es la Taq polimerasa. En una realización preferida adicional de la invención, la polimerasa es tanto la holoenzima polimerasa III de *E. coli* (McHenry, Ann. Rev. Biochem. 1988; 57:519), como la polimerasa del T7 (Schwager y col., Methods in Molecular and Cellular Biology (1989/90); Vol.1 (4): 155-159), o como la polimerasa del gen 5 del bacteriofago T7 complejada con Tiorredoxina de *E. coli* (Tabor y col., J. Biol. Chem. (1987); 262: 1612-1623). Cada una de estas enzimas polimerasas permite que la unión con el polinucleótido diana que suceda con una alta fidelidad, y por tanto mantiene el complejo polinucleótido - polimerasa, incluso cuando la polimerización no tiene lugar activamente.

La holoenzima de la polimerasa III se compone de tres subcomplejos que funcionan para crear la enzima procesiva: (I) el núcleo de la polimerasa, que incluye la subunidad α de la polimerasa; (II) la subunidad dimérica β que actúa como una estructura similar a un brazaletes del DNA; y (III) un subcomplejo de dos subunidades, τ e Υ , utilizadas para unir e hidrolizar ATP y así formar el dímero β alrededor del DNA.

Como primera etapa en el procedimiento de secuenciación, el polinucleótido diana se puede poner en contacto con un cebador apropiado en el tampón de hibridación/polimerización. Típicamente, el tampón estará a una temperatura suficientemente alta para romper (o fundir) cualquier estructura secundaria que exista en el polinucleótido diana. Cuando se enfría, el cebador se unirá a su complemento en la diana. Esta muestra puede seguidamente ponerse en contacto con la polimerasa inmovilizada para formar el complejo polinucleótido diana/polimerasa.

En una realización de la invención, la adición de los nucleótidos se controla de manera que los diferentes nucleótidos se añaden secuencialmente al complejo polimerasa/diana. Por ejemplo, puede añadirse

dGTP y permitir que pase sobre el complejo polimerasa/ polinucleótido; detectándose entonces cualquier incorporación. El dGTP no unido se va del sitio de reacción y se introduce un nucleótido adicional. De este forma, la detección de una interacción cinética puede relacionarse con el nucleótido particular presente en ese momento y la secuencia polinucleotídica puede entonces determinarse.

5

El procedimiento puede también llevarse a cabo con todos los diferentes nucleótidos presentes. Por ello, para llevarse a cabo con éxito, es necesario que los nucleótidos incorporen un grupo bloqueante al menos en la posición 3', pero preferiblemente en las posiciones 3' y 5'. Los grupos bloqueantes pueden ser fotosensibles y pueden eliminarse aplicando luz de una determinada longitud de onda, para liberar la molécula activa. Si los nucleótidos incorporan grupos bloqueantes en las posiciones 3' y 5', los grupos bloqueantes deben ser capaces de distinguirse en base a su absorbancia espectral, es decir debe ser posible eliminar selectivamente uno de los grupos bloqueantes aplicando luz a una longitud de onda específica que no elimine el otro grupo bloqueante. También es deseable que grupo bloqueante de la posición 3' necesite que la luz se aplique durante una mayor duración que la requerida para eliminar el grupo bloqueante de la posición 5'. Esto permite que los grupos bloqueantes se distingan tanto por medios espectrales como temporales.

Generalmente, los grupos bloqueantes fotosensibles sufren fotólisis a longitudes de onda en el intervalo de 200 nm a 450 nm. Los grupos bloqueantes derivarán típicamente de un compuesto de fórmula $R^1-[O-CO-] X$ en la que R^1 es un grupo fotolábil y X es un grupo saliente. Por ejemplo, R^1 es *o*-nitrobencilo. Los grupos bloqueantes que se prefieren de forma particular incluyen los grupos protectores de *o*-nitrobencilo descritos en el documento WO-A-92/10092 y en el WO-A-97/39151. Estos grupos incluyen nitroveratrilo-oxicarbonilo (NVOC), nitropiperonilo-oxicarbonilo (NPOC), α -metil-nitroveratrilo-oxicarbonilo (MeNVOC), α -metil-nitropiperonilo-oxicarbonilo (MeNPOC) y 1-pirenilmetilo-oxicarbonilo (PYMOC).

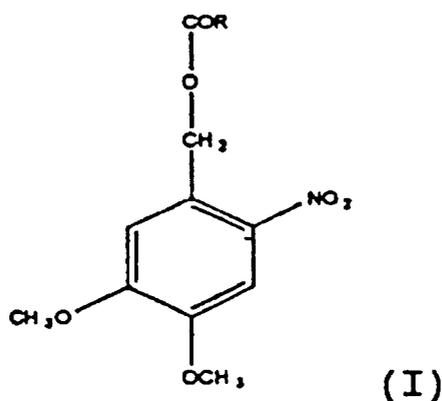
25

Un grupo bloqueante de 3' apropiado es el grupo (4,5-dimetoxi-2-nitrobencil) oxicarbonilo que puede formarse por reacción del nucleótido con un compuesto de fórmula (I):

30

35

40



45

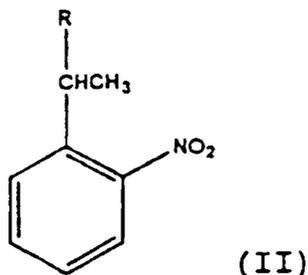
en la que R es un grupo de esterificación apropiado, por ejemplo metilo. Este grupo bloqueante puede eliminarse selectivamente con un pulso de luz con una longitud de onda de 360 nm.

50

Un grupo bloqueante apropiado en la posición 5' es el grupo 1-(2-nitrofenil) etilo (II):

55

60



en la que R es cualquier grupo funcional apropiado, por ejemplo un halógeno. Este grupo bloqueante puede eliminarse selectivamente a una longitud de onda de 260 nm.

Como ejemplo, los nucleótidos doblemente bloqueados se inyectan sobre el polinucleótido diana cebado (mantenido en asociación con un complejo de polimerasa de alta fidelidad), y se hace converger una luz monocromática cadena arriba de la polimerasa a una longitud de onda suficiente para liberar el grupo bloqueante del fosfato terminal de cada nucleótido. Seguidamente los nucleótidos son capaces de pasar sobre la polimerasa unida, y puede ocurrir que se incorporen a la cadena polinucleotídica naciente. Sin embargo, como el grupo bloqueante en la posición 3' permanece unido, sólo se incorpora un nucleótido. Por lo tanto, la medida de la interacción cinética suministrará información acerca del nucleótido particular incorporado a la cadena naciente. La polimerasa utilizada puede ser una polimerasa de alta fidelidad que no se disocia fácilmente de la diana cuando la reacción se detiene. Por otra parte, puede utilizarse un inhibidor competitivo para evitar la disociación de la polimerasa de la diana.

Después de medir el nucleótido incorporado, se hace converger un pulso de luz monocromática en el grupo bloqueante dentro del sitio catalítico de la polimerasa, para eliminar el grupo bloqueante en la posición 3'. El pulso de luz monocromática puede tener una duración mayor que la necesaria para la eliminación en la posición 5', y de esa forma solamente el grupo bloqueante asociado al nucleótido en el complejo de polimerasa experimentará la separación. Esto reduce la probabilidad de adición de nucleótidos no asociados al complejo de la polimerasa.

Una vez que el grupo bloqueante 3' se libera, se permite continuar la reacción de la polimerasa a medida que llegan los nucleótidos adicionales al sitio de la reacción de la polimerasa. La polimerización descontrolada se evita alternando los pulsos de luz requeridos para eliminar los grupos bloqueantes.

Aunque se prefiere utilizar nucleótidos doblemente bloqueados, como se ha descrito anteriormente, el procedimiento puede también llevarse a cabo utilizando nucleótidos que tengan un grupo bloqueante en la posición 3' solamente. En este caso es conveniente utilizar un inhibidor competitivo de la polimerasa, que reducirá la probabilidad de que un nucleótido, que pierde un grupo bloqueante en la posición 3', se incorpore en la cadena naciente. Un inhibidor competitivo apropiado de la polimerasa es el carbonildi-fosfonato (COMDP).

El siguiente ejemplo ilustra la invención mediante referencia a los dibujos.

Ejemplo

El siguiente análisis se llevó a cabo en un sistema BIAcore 200 modificado (BIAcore AB, UPPSALA, Suecia) con un chip sensor CM5 (calidad de investigación, BIAcore AB) como superficie sensora óptica. El instrumento fue suministrado con un cartucho de microflujo integrado (IFC) que permite el análisis en cuatro celdas mediante una inyección única de la muestra.

Preparación de la polimerasa

La holoenzima polimerasa III de *E. coli* se preparó según (Millard y col., Methods Enzymol. (1995); 262: 22) que utiliza cromatografía de interacción hidrofóbica sobre valilsefarosa, para purificar la holoenzima a altas concentraciones salinas. Después de la purificación, la enzima aislada se concentró utilizando la técnica de filtración iónica descrita por Kirkegaard y col., Anal. Biochem. (1972); 50: 122.

Inmovilización de la polimerasa

La inmovilización de la polimerasa en la superficie del chip sensor se llevó a cabo según (Jönson y col., Biotechniques (1991); 11:620-627). Brevemente, el entorno del chip sensor se equilibró con tampón Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia) 0,05 %, pH 7,4). Se mezclaron juntos volúmenes iguales de N-hidroxisuccinimida (0,1 M en agua) y N-etil-n'--(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (0,1 M en agua) y se inyectaron a través de la superficie del chip (CM5), para activar el dextrano carboximetilado. El núcleo del subcomplejo polimerasa III (160 μ l, 500 U) se mezcló con acetato sódico 10 mM (100 μ l, pH 5) y se inyectó a través de la superficie activada. Finalmente, los ésteres residuales de N-hidroxisuccinimida de la superficie del chip sensor se hicieron reaccionar con etanolamina (35 μ l, 1 M en agua, pH 8,5), y la polimerasa no unida se eliminó de la superficie. El procedimiento de inmovilización se realizó con un flujo continuo de tampón Hepes (5 μ l/min) a una temperatura de 25°C.

Oligonucleótidos

Se sintetizaron dos oligonucleótidos utilizando la química de la fosforamidita estándar. El oligonucleótido definido como SEQ ID N° 1 se utilizó como polinucleótido diana, y el oligonucleótido definido como SEQ ID N° 2 se utilizó como cebador.

CAAGGAGAGGACGCTGTCTGTCTCGAAGGTAAGGAACGGACGAGAGAAGGGAGAG
 SEQ ID N° 1
 CTCTCCCTTCTCTCGTC SEQ ID N° 2

Los dos oligonucleótidos se hicieron reaccionar en condiciones de hibridación para formar el complejo diana cebador.

Seguidamente el DNA cebado se resuspendió en tampón (Tris-HCl 20mM, pH 7,5, MgCl₂ 8 mM, glicerol 4% (v/v), ditiotreitól (DDT) 5mM, 40 μ g albúmina sérica bovina) que contiene 21 μ g de proteína del subcomplejo de proteína de unión a ssDNA pol III, requerido para formar una estructura similar a un brazaletes 1,6 pmol es de dímero β y 195 fmol es de subunidades Υ). Se empleó ATP 0,5 mM junto con carbonildifosfonato (COMDP) 60 μ M. En esta reacción, la subunidad Υ actúa como un acoplante molecular, hidrolizando el ATP para colocar las subunidades del dímero β en el DNA y formar el sub-complejo de la polimerasa (Studwell y col., UCLA Simp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 1990; 127: 153).

El complejo DNA cebado/subcomplejo se inyectó seguidamente sobre la polimerasa III en la superficie del chip sensor a una velocidad de flujo de 5 μ l/min, y se le permitió unirse a la polimerasa por medio de la acción de las subunidades Υ .

En este experimento son necesarios magnesio y ATP para que la Pol III se una al DNA cebado. Sin embargo, el magnesio también promueve la eliminación del cebador por la actividad exonucleasa 3'-5' de prueba de lectura. Este problema se puede superar incluyendo el carbonildifosfonato, que es un inhibidor competitivo de la actividad de la polimerasa (puede usarse una pol III carece de actividad exonucleasa 3'-5' para evitar este problema particular).

Se mantiene un flujo continuo de carbonildifosfonato 60 μ M sobre la superficie del chip para evitar que la actividad exonucleasa elimine el cebador del DNA diana.

35 *Nucleótidos que incorporan dos grupos bloqueantes*

Cada nucleótido (dCTP, dTTP, dGTP y dATP) contenía un grupo bloqueante de 1-(2-nitrofenil) etilo en la posición 5' y un grupo bloqueante (4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil) oxicarbonilo en la posición 3', como se muestra en la Figura 3. La síntesis de los nucleótidos doblemente bloqueados fue como sigue:

Etapa 1

Síntesis de (4,5-dimetoxinitrobenzil) oxicarboniltrifosfato de nucleósido

El mismo procedimiento general se aplicó a dGTP, dCTP y dTTP. Una mezcla de dATP dihidratado (0,4 mmoles) y aproximadamente 3 mmoles de 4,5-dimetoxi-2-nitrofenildiazometano, recién preparado a partir de 900 mg (4 mmoles) de 4,5-dimetoxi-2-nitrofenilhidrazona (sintetizada mediante tratamiento del 6-nitroveraldehído con monohidrato de hidracina en cloroformo por el procedimiento de Wootton y Trentham, Photochemical Probes in Biochemistry (Nielsen, P.E., Ed.) NATO ASI Ser. C, Vol. 272, p277-296 (1989), se agitó en 15 ml de DMSO a temperatura ambiente en oscuridad durante 40 h. El control de la reacción por TLC en un sistema disolvente de cloroformo/metanol (5:1 v/v) reveló la aparición de una mancha con un Rf de 0,54 correspondiente al nucleótido fijado. Se eliminaron el DMSO, el compuesto diazo sin reaccionar, y los productos de reacción con baja polaridad mediante extracción repetida con 60 ml de éter. El material residual, que entre otras sustancias contenía nucleótidos sin reaccionar y el producto deseado, se disolvió en una cantidad mínima de cloroformo y se separó mediante cromatografía ultrarrápida en columna de sílice (3 x 30 cm). La elución con cloroformo 100% y metanol/cloroformo (95:5 v/v) separó los productos secundarios hidrofóbicos de 4,5-dimetoxi-2-nitrofenildiazometano de la columna. Las fracciones se secaron en un evaporador rotatorio. Seguidamente se liofilizaron 78 mg del producto fijado. El rendimiento total fue del 45%. El dATP bloqueado en 3' con 4,5-dimetiloxi-2-nitrobenzilo carbonilo se aisló directamente con una pureza mayor mediante una cromatografía HPLC preparativa de fase inversa a partir del producto crudo.

Etapa 2

Adición del grupo 1-(2-nitrofenil) etilo en 5' al dATP bloqueado en 3' con 4,5-dimetoxi-2-nitrobenciloxicarbonilo

5 Una mezcla de dATP bloqueado en 5' con 4,5-dimetiloxi-2-nitrobenciloxicarbonilo (0,4 mmoles) y aproximadamente 3 mmoles de 1-(2-nitrofenil) diazoetano, recién preparado a partir de 716,7 mg (4 mmoles) de hidrazona de 2-nitroacetofenona (sintetizada por tratamiento de 2-nitroacetofenona con monohidrato de hidracina en etanol) y 2,9 g (30 mmoles) de MnO₂ (90%) en 20 ml de cloroformo por el
10 procedimiento de Walker y col., (Walker y col., Methods Enzymol. 1989; 172: 288-301), se agitó en 15 ml de DMSO a temperatura ambiente en oscuridad durante 40 h. El control de la reacción por TLC en un sistema disolvente de cloroformo/metanol (5:1 v/v) reveló la aparición de un par de manchas con un R_f de 0,68 y un R_f de 0,58, correspondiente a los dos diaestereoisómeros de la forma axial y los dos diaestereoisómeros de la forma ecuatorial del éster de 1-(2-nitrofenil) etilo de dATP bloqueado en 5' con
15 4,5-dimetoxi-2-nitrofeniloxicarbonilo, respectivamente. El DMSO, el compuesto diazo sin reaccionar, y los productos de reacción de baja polaridad se separaron por extracción repetida con 50 ml de éter.

El material residual, que, entre otras sustancias, contenía dATP bloqueado en 5' con 4,5-dimetoxi-2-nitrobenciloxicarbonilo sin reaccionar y el dATP doblemente bloqueado deseado, se disolvió en una
20 cantidad mínima de cloroformo y se separó por cromatografía rápida en columna de sílice de 3 x 30 cm. La elución con cloroformo 100% eliminó los productos secundarios hidrofóbicos de 1-(2-nitrofenil) diazoetano de la columna. El producto se secó en un evaporador rotatorio. La liofilización dio 74 mg del compuesto inmovilizado. El rendimiento total fue del 57%.

25 Cada nucleótido estuvo presente a una concentración de 0,2 mM en el tampón de polimerización (Tris-HCl 1mM, pH 8,8, KCl 8,5 mM, MgCl₂ 0,15 mM, gelatina 0,01% (p/v)).

Secuenciación del DNA

30 La Figura 1 muestra un sistema de sensibilidad de SPR y una celda de fluido (7), que tiene un medio para aplicar una radiación electromagnética (1) a un chip sensor (2) con una enzima polimerasa inmovilizada (3) en la superficie del sensor, una entrada (4) para introducir los diferentes nucleótidos en la celda y dos montajes de enfoque (5) y (6) para aplicar el pulso de la luz monocromática en la celda.

35 Los diferentes nucleótidos se introducen en la celda de fluido (7) con una velocidad de flujo de 30 µl/min., a una temperatura de 25°C y una velocidad de recogida de datos de 10 Hz. A medida que los nucleótidos pasan al montaje de enfoque (5), se aplica un pulso de luz monocromática a una longitud de onda de 260 nm para eliminar el grupo bloqueante de la posición 5'. Seguidamente los nucleótidos pasan sobre el chip sensor (2) y se ponen en contacto con el complejo polinucleótido diana/polimerasa (3) que se mantiene en su sitio por el subcomplejo del dímero β. Puesto que la posición 3' de la secuencia del cebador está libre para reaccionar, la polimerización puede tener lugar a medida que un nucleótido se
40 incorpora sobre su complemento en el polinucleótido diana. Seguidamente esta incorporación se detecta mediante la luz p-polarizada monocromática del dispositivo de SPR. Puesto que el nucleótido incorporado tiene un grupo bloqueante a en la posición 3' no se produce ninguna polimerización adicional, ya.
45 Seguidamente el montaje de enfoque emite un pulso de luz monocromática de longitud de onda de 360 nm (6) en el sitio de la polimerización. La alta velocidad de flujo en la celda del fluido asegura que los nucleótidos no unidos a la polimerasa se separen de la celda antes de que se haya absorbido una energía suficiente para liberar sus grupos bloqueantes en 3'.

50 Una vez que el grupo bloqueante en 3' se ha liberado del nucleótido polimerizado, se puede producir una polimerización adicional.

La Figura 2 muestra los resultados del experimento de secuenciación con cada nucleótido incorporado en la cadena naciente que se detecta. Los resultados muestran una secuencia complementaria a la de la
55 Secuencia número 1.

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la secuenciación de un polinucleótido, que comprende las etapas de :
 - 5 (i) hacer reaccionar un polinucleótido diana con una enzima polimerasa que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y los diferentes nucleótidos, en condiciones suficientes para la reacción de la polimerasa; y
 - 10 (ii) detectar un efecto consecuente a la incorporación de un nucleótido específico complementario al polinucleótido diana, llevándose a cabo la detección mediante medida de la radiación.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo con cada uno de los diferentes nucleótidos por turnos, hasta que se detecta la incorporación, y seguidamente se repite.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (i) se se lleva a cabo con todos los nucleótidos presentes.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los nucleótidos comprenden un grupo bloqueante en 3' que se elimina después de la reacción de la polimerasa.
- 20 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el grupo bloqueante puede eliminarse selectivamente mediante pulsos de luz monocromática.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que los nucleótidos comprenden un grupo bloqueante adicional en el grupo fosfato terminal de la cadena de trifosfato, y el grupo bloqueante adicional se elimina antes de la eliminación del grupo bloqueante en 3'.
- 30 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el grupo bloqueante adicional puede eliminarse selectivamente mediante pulsos de luz monocromática en condiciones diferentes de las requeridas para eliminar el grupo bloqueante en 3'.
- 35 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que el grupo bloqueante adicional se elimina mediante pulsos de luz monocromática de una duración diferente de la requerida para eliminar el grupo bloqueante en 3'.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (i) comprende además la introducción de un inhibidor competitivo de la enzima polimerasa.
- 40 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polinucleótido diana de la etapa (i) se une a la enzima polimerasa mediante un complejo de dímero β_2 .
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la polimerasa es la DNA polimerasa III de *E. coli* o la polimerasa T7.
- 45 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la polimerasa es la Taq polimerasa.
13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la polimerasa es la transcriptasa reversa.
- 50 14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) comprende la detección de un cambio en la señal de resonancia durante un tiempo.
- 55 15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la radiación es electromagnética.
16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que la radiación electromagnética está en el espectro infrarrojo.
- 60 17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) comprende el uso de resonancia del plasmón superficial.

18. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que la radiación electromagnética está en el espectro de radiofrecuencia.

19. Un procedimiento según la reivindicación 18, en el que la incorporación de un nucleótido se detecta
5 usando resonancia magnética nuclear.

20. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polinucleótido es DNA.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

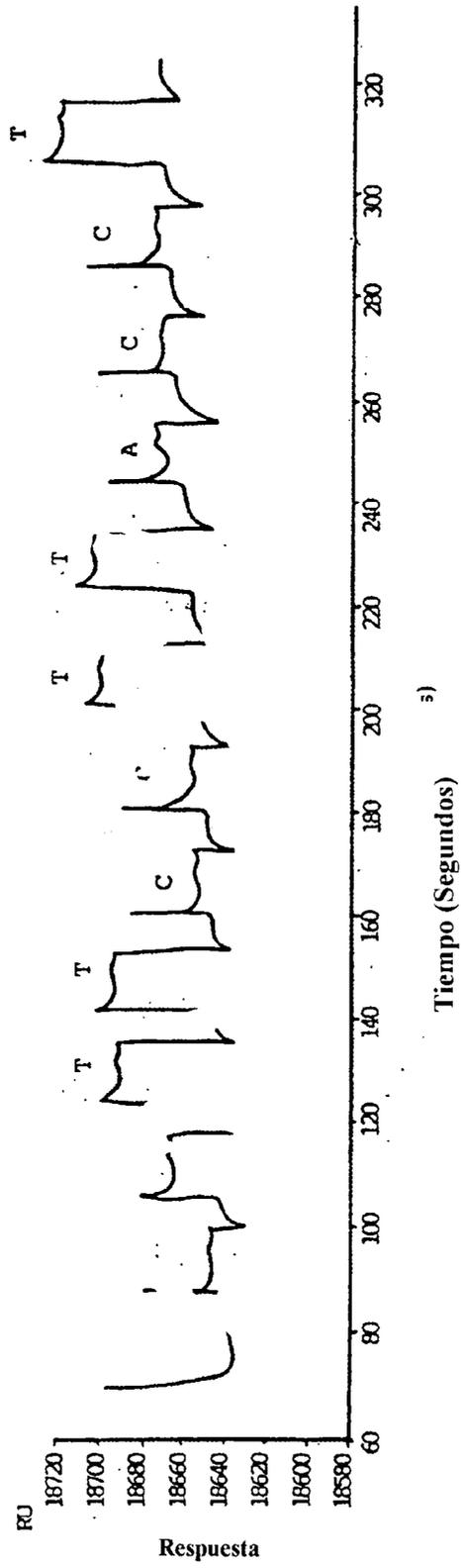


Figura 2a

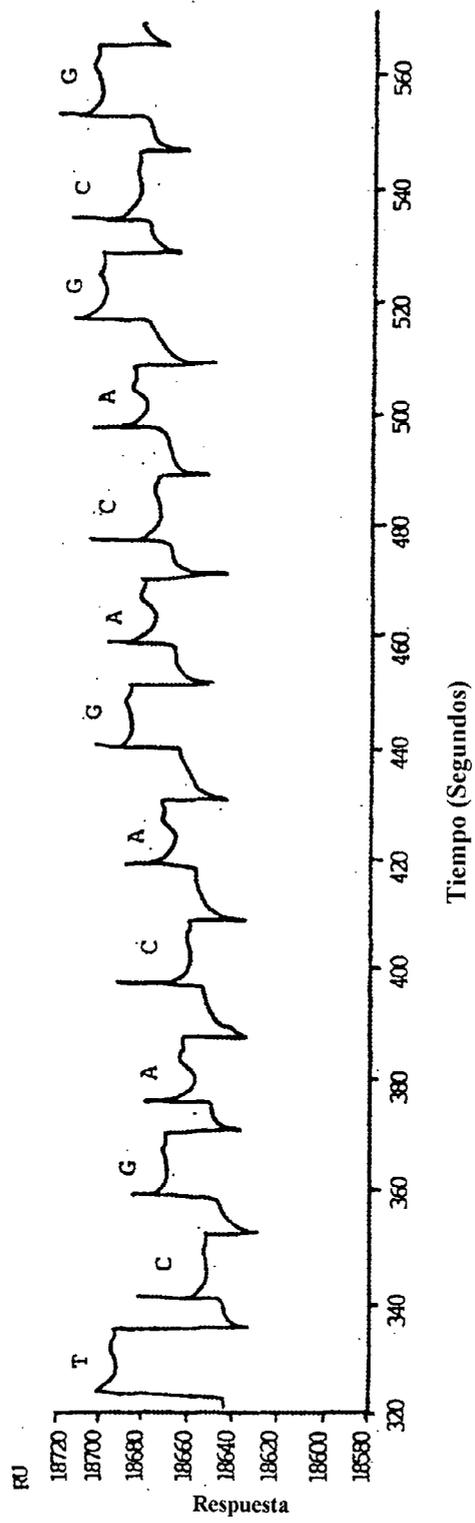


Figura 2b

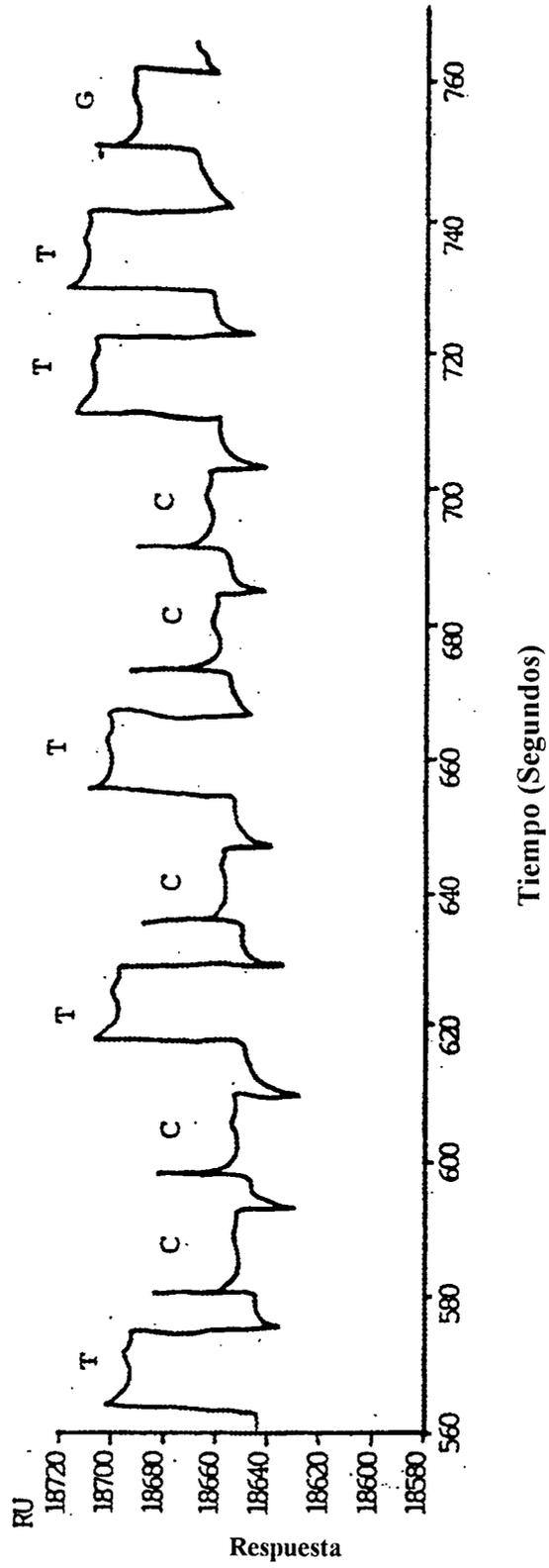


Figura 2c

