

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 722**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06847988 .0**
96 Fecha de presentación: **20.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1974057**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Secuenciación y genotipado utilizando nucleótidos modificados en 2' de forma reversible**

30 Prioridad:
21.12.2005 US 752827 P
11.09.2006 US 844041 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
GELFAND, David H. y
GUPTA, Amar P.

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 722 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

Secuenciación y genotipado utilizando nucleótidos modificados en 2' de forma reversible.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las técnicas de análisis de secuencia del ADN han evolucionado para manejar de forma eficiente proyectos de secuenciación a gran escala. Sin embargo, existen limitaciones en las técnicas actualmente disponibles cuando se aplican a proyectos de secuenciación de alto rendimiento en los que es deseable limitar los costes manteniendo una velocidad suficiente. Por ejemplo, los métodos clásicos de secuenciación didesoxi de Sanger utilizan una etapa de separación de fragmentos de ADN sobre un gel. Esta etapa no se presta a la multiplexación a gran escala o al procesamiento en paralelo y además, presenta el problema de la compresión de bandas durante la electroforesis. Se han desarrollado otras técnicas para incrementar la velocidad y disminuir el coste de la secuenciación. Entre ellas se incluyen la secuenciación mediante hibridación (ver, por ejemplo, Bains y Smith, *J. Theoret. Biol.* 135:303-307, 1988; Drmanac y otros *Genomics* 4:114-128, 1989; Khrapko y otros *FEBS Lett.* 256:118-122, 1989; Southern, WO10977, 1989); secuenciación de firmas en paralelo basada en el enlazado y escisión (por ejemplo, Brenner y otros *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:1665-1670, 2000); secuenciación utilizando nucleótidos terminadores de cadena reversibles (ver, por ejemplo, Patentes EEUU nº 5.902.723 y 5.547.835; Canard y Arzumanov, *Gene* 11:1 (1994); y Dyatkina Arzumanov, *Nucleic Acids Symp Ser* 18:117 (1987)); terminación de cadena reversible con ADN ligasa (ver, por ejemplo, Patente EEUU nº 5.403.708); secuenciación resuelta en el tiempo (ver, por ejemplo, Johnson y otros, *Anal. Biochem.* 136:192 (1984); y la pirosecuenciación (por ejemplo, Ronaghi y otros *Anal. Biochem* 242:84-89, 1996).

La pirosecuenciación se basa en el concepto de la secuenciación mediante síntesis (por ejemplo, Patente EEUU nº 4.863.849). La técnica puede aplicarse a proyectos de secuenciación en paralelo masivos. Por ejemplo, utilizando una plataforma automatizada, es posible realizar cientos de miles de reacciones de secuenciación de forma simultánea. La secuenciación mediante síntesis se diferencia de la estrategia de secuenciación didesoxi clásica en que en lugar de generar un gran número de secuencias de forma simultánea para caracterizarlas en una etapa posterior, se utiliza la monitorización en tiempo real de la incorporación de cada base dentro de una cadena en crecimiento. Aunque esta estrategia es lenta en el contexto de una reacción de secuenciación individual, puede utilizarse para generar una gran cantidad de información de secuencias en cada ciclo cuando se realizan entre cientos de miles y millones de reacciones en paralelo. A pesar de estas ventajas, existen aún limitaciones en la estrategia de pirosecuenciación. Por ejemplo, existen dificultades para determinar el número de nucleótidos incorporados en regiones homopoliméricas, debido a la respuesta de señal no lineal tras la incorporación de múltiples moléculas idénticas. Otras estrategias de secuenciación mediante síntesis sobre matrices en fase sólida que no utilizan terminadores reversibles presentan desventajas similares.

Recientemente, se ha descrito un método de secuenciación que utiliza terminadores reversibles utilizando análogos de nucleótido con modificaciones 3'-O-alilo (Ruparel y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:5932-5937, 2005). En este método, el análogo de nucleótido contiene un grupo alilo que encapucha el grupo 3'-OH y un fluoróforo unido a la posición 5' del uracilo a través de un enlazador fotoescindible. Este nucleótido es un sustrato para la ADN polimerasa. Tras la incorporación dentro de la cadena de ADN y la fotoescisión del enlazador, se elimina el grupo alilo utilizando una reacción catalizada por Pd, y se reinicia la reacción de la polimerasa. De este modo, estos análogos actúan como terminadores reversibles en las reacciones de secuenciación mediante síntesis. Se describen otros terminadores reversibles en, por ejemplo, las Patentes EEUU nº 5.872.244; 6.232.465; 6.214.987; 5.808.045; 5.763.594, y 5.302.509; y la Publicación de solicitud de patente EEUU nº 20030215862. Los terminadores reversibles del tipo 3'-OH bloqueados presentan diversos inconvenientes incluyendo unas bajas eficiencias de incorporación y desbloqueo y las condiciones tediosas utilizadas para el desbloqueo. Un método altamente deseable para la secuenciación de alto rendimiento basada en terminadores reversibles debe demostrar unas eficiencias de incorporación, terminación de cadena y desbloqueo casi perfectas para minimizar los problemas y las señales de fondo generadas por las reacciones desfasadas.

Recientemente se han descrito nucleósidos 5' trifosfato modificados en 2' (por ejemplo 2'-fosfato) que pueden utilizarse como sustratos para ciertas enzimas de polimerización de ácidos nucleicos para la incorporación de una sola base (ver, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente EEUU nº 2005/00373898 y 2005/0037991). La presente invención da a conocer nuevos métodos para la secuenciación y el genotipado que utilizan nucleótidos terminadores en 2' en una reacción de secuenciación reversible.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer, por ejemplo, un método para determinar una secuencia de ácidos nucleicos utilizando un nucleótido modificado en 2' que sirve como terminador reversible. En algunas

realizaciones, la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' dentro de una cadena de ácidos nucleicos que está siendo alargada da lugar a una señal detectable. Como métodos ejemplares de detección de señales detectables se incluyen, por ejemplo, la detección del pirofosfato liberado por cascadas enzimáticas acopladas que da lugar a una señal luminosa, la detección de un marcador fluorescente en el nucleótido incorporado (escindible, para múltiples adiciones), la detección de un nucleósido marcado en el fosfato terminal, la detección a través de una estrategia polifosfato / fosfatasa, entre otros métodos. El tratamiento del nucleótido incorporado con una actividad para eliminar la modificación o el grupo bloqueador da lugar a la extensión adicional de la cadena de ácidos nucleicos. La presente invención incluye de forma adicional, por ejemplo, kits que comprenden los componentes para determinar una secuencia, por ejemplo, para secuenciar, genotipar y similares utilizando el método de terminación reversible de la invención.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un método para la secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde, comprendiendo dicho método:

- a) Incubar al menos un ácido nucleico molde con al menos una polimerasa, al menos un nucleótido terminador reversible modificado en 2' que comprende un grupo bloqueador en la posición 2' de la fracción azúcar, en el que el grupo bloqueador en la posición 2' es un fosfato (por ejemplo, un 2'-monofosfato-3'-hidroxil nucleótido, etc.), y al menos un ácido nucleico cebador complementario de al menos una subsecuencia del ácido nucleico molde, de manera que la polimerasa extiende el ácido nucleico cebador produciendo al menos un producto de extensión del cebador que incorpora el nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el extremo 3' del producto de extensión del cebador;
- b) Eliminar el grupo bloqueador (por ejemplo un fosfato o similar) de la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el extremo 3' del producto de extensión del cebador, y,
- c) Identificar el nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto de extensión del cebador antes y/o durante
 - (b) de manera que al menos una parte de la secuencia de bases del ácido nucleico molde es determinable a partir del nucleótido terminador reversible modificado en 2' identificado, secuenciándose de este modo al menos una parte del ácido nucleico molde. En algunas realizaciones, (b) comprende incubar el producto de extensión del cebador con una actividad que elimina el grupo bloqueador (por ejemplo, un fosfato, etc.) en la posición 2'. El método incluye, típicamente, repetir (a)-(c) una o más veces. En algunas realizaciones, la modificación en la posición 2' es un fosfato o un fosfato modificado, que puede eliminarse, por ejemplo, enzimáticamente utilizando un enzima como, por ejemplo, una fosfatasa, una exonucleasa III, una endonucleasa IV, una polinucleótido quinasa, una fosfodiesterasa o una combinación de una fosfodiesterasa y una fosfatasa. En algunas realizaciones en las que se utilizan enzimas fosfodiesterasa, tales como las diesterasas del veneno de serpiente, se modifican los nucleótidos terminadores para que contengan, por ejemplo, una modificación alfa-fósforotioato.

En las realizaciones típicas, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' se selecciona del grupo formado por las estructuras mostradas en las figuras 1A a 1H.

En algunas realizaciones, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' se marca con al menos un grupo marcador, tal como un colorante fluorescente, una molécula luminiscente, o un radioisótopo. En algunas realizaciones, el grupo marcador puede unirse al nucleótido terminador reversible modificado en 2' en la base mediante un enlazador escindible, comprendiendo el método de forma adicional una etapa de escisión del enlazador. El marcador puede unirse en varias posiciones, tales como el residuo azúcar del nucleótido terminador reversible modificado en 2' o un fosfato presente en la posición modificada 2' o en el fosfato terminal de la parte polifosfato. En algunas realizaciones, los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' utilizados en los métodos descritos en la presente invención no están marcados.

En algunas realizaciones, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' está unido a dos fracciones marcadores que comprenden un dador y un aceptor, tales como un informador fluorescente y un par desactivador. En realizaciones concretas, el dador y el aceptor son capaces de experimentar transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

La presente invención incluye realizaciones en las cuales la fracción desactivadora está unida a la base del nucleótido terminador reversible modificado en 2' y la fracción informadora está unida a un fosfato, siempre y cuando dicho fosfato no sea el fosfato alfa del nucleótido terminador reversible modificado en 2'. Por ejemplo, el fosfato puede ser un fosfato delta o gamma terminal de la parte polifosfato, un fosfato beta o un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.

En algunas realizaciones, una fracción de marcado está unida a un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2' y la segunda fracción de marcado está unida a un segundo fosfato, por ejemplo, un fosfato gamma o similar. En algunas realizaciones, estas fracciones de marcado incluyen, por ejemplo, fracciones informadoras y desactivadoras. Los métodos de la invención incluyen

realizaciones en las que la mezcla de reacción comprende cuatro nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferentes, poseyendo cada uno de ellos una base diferente y estando marcados con fracciones de marcado diferentes, de manera que se genera una señal diferente para cada nucleótido. En algunas realizaciones, los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' utilizados en los métodos descritos en la presente invención no están marcados. Como realizaciones alternativas se incluyen una etapa de detección que comprende detectar el pirofosfato generado con la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.

También se da a conocer un kit para determinar una secuencia, por ejemplo para resecuenciación, para secuenciación de novo, genotipado o similares, que comprende: al menos un nucleótido terminador reversible modificado en 2' que comprende un fosfato como grupo bloqueante en la posición 2' de la fracción azúcar y un reactivo para eliminar la modificación en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2'. A modo de ejemplo, el kit puede incluir un reactivo seleccionado del grupo formado por una fosfatasa, una exonucleasa, una fosfodiesterasa, una endonucleasa IV y una polinucleótido quinasa. Dicho kit puede incluir además una polimerasa.

En algunas realizaciones, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' incluido en el kit está unido a un marcador. El kit puede incluir opcionalmente al menos un nucleótido extensible.

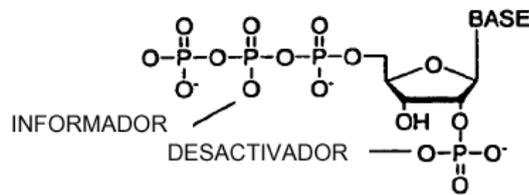
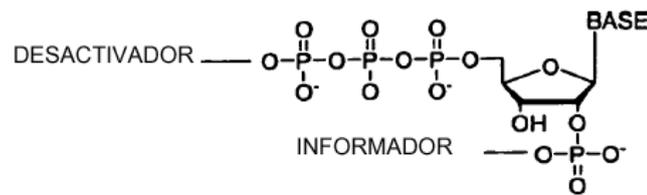
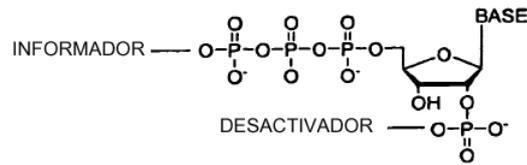
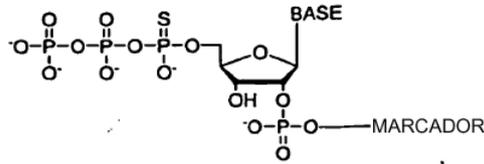
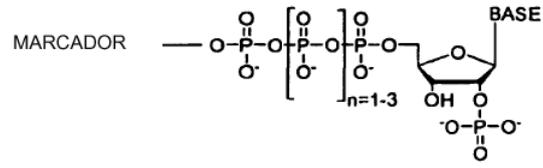
La presente invención también da a conocer un método de genotipado, que comprende:

- a) Incubar un ácido nucleico molde con una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa, y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', comprendiendo dicho terminador reversible modificado una de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas y comprendiendo además una modificación en la posición 2' de la fracción azúcar, siendo dicha modificación en la posición 2' un fosfato que termina la síntesis bajo condiciones en las que el cebador se hibrida con el ácido nucleico molde y se extiende por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido;
- b) Determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- c) Si dicha señal no está presente, repetir las etapas a) y b) con un nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente, comprendiendo dicho nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente una base diferente de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas,
- d) Incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible,
- e) Repetir las etapas a) a d) un número deseado de veces para determinar la secuencia de una parte de dicho ácido nucleico molde, y
- f) Comparar la secuencia de la parte del ácido nucleico molde con secuencias conocidas de un sitio polimórfico.

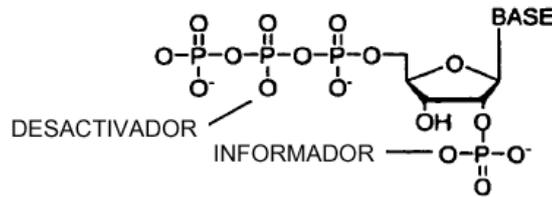
También se da a conocer un sistema para la secuenciación de un ácido nucleico, que comprende:

Un ciclador térmico que comprende una cámara de reacción en la que se incuba un ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa, y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', comprendiendo dicho terminador reversible modificado una de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas y comprendiendo además una modificación en la posición 2' de la fracción azúcar, siendo dicha modificación en la posición 2' un fosfato que termina la síntesis, siendo el ciclador térmico efectivo para crear unas condiciones en las que el cebador se hibrida con el ácido nucleico molde y se extiende por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido; teniendo dicha cámara de reacción una abertura de entrada y una abertura de salida para añadir y retirar reactivos; y un detector, cuyo detector es efectivo para la detección de una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en posición 2' en el producto extendido.

También se da a conocer un nucleótido terminador reversible modificado en 2' seleccionado del grupo formado por:



y



5

En algunas realizaciones, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' al que se hace referencia en la presente invención no está marcado.

10 La presente invención también da a conocer un método de secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde, que comprende:

- 15 a) Incubar un ácido nucleico molde con una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa, y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', que comprende un fosfato como grupo bloqueador en la posición 2' de la fracción azúcar, bajo condiciones en las que el cebador se hibrida con el ácido nucleico molde y se extiende por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido;
- b) Determinar la presencia de una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- 20 c) Incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible,

- d) Repetir las etapas a) a c) un número deseado de veces para determinar la secuencia de una parte de dicho ácido nucleico molde.

5 En alguna realización, la etapa (a) se lleva a cabo utilizando una serie de nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferentes en una única mezcla de reacción, comprendiendo cada uno de los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' una base diferente. Por ejemplo, pueden añadirse secuencialmente cada uno de los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferentes hasta que se detecte una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' al producto extendido. Alternativamente, pueden añadirse simultáneamente todos los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' en una realización en la que los diferentes nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' se marcan con fracciones marcadoras diferentes.

10 En otro aspecto, la presente invención da a conocer un método para la secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde que comprende:

- 15 a) Incubar un ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa, y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', comprendiendo dicho terminador reversible modificado una de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas y comprendiendo además una modificación en la posición 2' de la fracción azúcar, siendo dicha modificación en la posición 2' un fosfato que termina la síntesis bajo condiciones en las que el cebador se hibrida con el ácido nucleico molde y se extiende por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido;
- 20 b) Determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- 25 c) Si dicha señal no está presente, repetir las etapas a) y b) con un nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente, comprendiendo dicho nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente una base diferente de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas,
- 30 d) Incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible, y
- e) Repetir las etapas a) a d) un número deseado de veces para determinar la secuencia de una parte de dicho ácido nucleico molde.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Las figuras 1A-1H muestran terminadores reversibles modificados en 2' ejemplares. La figura 2 muestra productos de extensión del cebador marcados con colorante FAM de cuatro ciclos de extensión y desbloqueo, según una realización de la invención. La figura 3 muestra la extensión ciclada de cebadores utilizando terminadores reversibles modificados en 2' marcados con colorante, según una realización de la presente invención.

40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 La presente invención da a conocer, por ejemplo, un método para llevar a cabo una secuenciación utilizando nucleótidos modificados que poseen una modificación en la posición OH 2' que puede terminar la extensión de una cadena de ácidos nucleicos. A continuación, típicamente la modificación en la posición OH 2' es eliminada en una etapa subsiguiente, transformando el nucleótido recién añadido en extensible, para permitir la extensión adicional de la cadena. La incorporación del nucleótido terminador modificado en 2' da lugar en última instancia a una señal detectable, ya sea directa o indirectamente. La señal detectable puede ser generada en el momento en que el terminador es incorporado o cuando se elimina la modificación. El método puede utilizarse, por ejemplo, en métodos de secuenciación de alto rendimiento para determinar la secuencia de un ácido nucleico deseado y para aplicaciones tales como el genotipado.

50

Definiciones

55 El término "nucleótido terminador reversible modificado en 2'" (también denominado en ocasiones "terminador reversible modificado en 2'") se refiere a un análogo de nucleótido que comprende un grupo bloqueador eliminable en la posición 2' de la fracción azúcar del nucleótido. Un "grupo bloqueador eliminable" se refiere a una fracción o grupo químico que termina al menos parcialmente la extensión de un ácido nucleico tras la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2', pero que puede ser eliminado de manera que puede restaurarse la extensión de la molécula de ácido nucleico. La naturaleza del grupo bloqueador no es crítica para la invención siempre y cuando la presencia del grupo bloqueador termine la extensión, y ésta se restaure tras la escisión del grupo bloqueador. Es un grupo bloqueador eliminable ejemplar el grupo fosfato. En la presente invención también se describen otros grupos bloqueadores representativos. Como nucleótidos terminadores en 2' ejemplares se incluyen los nucleótidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato y los nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-difosfato. Los nucleótidos terminadores en 2' a utilizar en la

65

presente invención se describen en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente EEUU nº 20050037991 y 20050037398.

El medio concreto para eliminar el grupo bloqueador dependerá, obviamente, del grupo bloqueador a eliminar y tampoco es crítico para la presente invención. Típicamente, el grupo bloqueador eliminable tampoco es crítico para la presente invención. Típicamente, el grupo bloqueador eliminable se elimina mediante medios enzimáticos, químicos o fotoquímicos.

El término "ácido nucleico" se refiere a nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos terminadores en 2', didesoxinucleótidos, etc.) y polímeros (entre los que se incluyen, por ejemplo, ácidos desoxirribonucleicos (ADNs), ácidos ribonucleicos (ARNs), híbridos ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, genes, ADNcs, aptámeros, ácidos nucleicos anti-sentido, ARNs interferentes (ARNi), balizas moleculares, sondas de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), conjugados PNA-ADN, conjugados PNA-ARN, etc.) que comprenden dichos nucleótidos unidos covalentemente entre sí, ya sea de forma lineal o ramificada. Un ácido nucleico es típicamente de cadena única o doble y en general contendrá enlaces fosforodiéster, aunque en algunos casos, tal como se especifica en la presente invención, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, por ejemplo y sin carácter limitante, fosforamida (Beaucage y otros (1993) *Tetrahedron* 49(10): 1925) y las referencias del mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl y otros (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger y otros (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487; Sawai y otros (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger y otros (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 y Pauwels y otros (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419, fosforotioato (Mag y otros (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y Patente EEUU nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu y otros (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), enlaces metilfosfonato (ver Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* ("Oligonucleótidos y análogos: Un enfoque práctico, Oxford University Press (1992)), y esqueletos y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (ver, Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier y otros (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; Carlsson y otros (1996) *Nature* 380:207). Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos con esqueletos cargados positivamente (Denpcy y otros (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097); esqueletos no iónicos (Patentes EEUU nº 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; *Angew* (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger y otros (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger y otros (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"* ("Modificaciones de carbohidratos en la investigación antisentido"), Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker y otros (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs y otros (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996) y esqueletos sin ribosa incluyendo los descritos en las Patentes EEUU nº 5.235.033 y 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7 de la *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"* ("Modificaciones de carbohidratos en la investigación antisentido"), Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook. También se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (ver Jenkins y otros (1995) *Chem. Soc. Rev.* pag. 169-176). También se describen diversos análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls, *C & E News Jun. 2, 1997* página 35.

Además de aquellas bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), entre los análogos de ácidos nucleicos también se incluyen aquellos que poseen bases heterocíclicas no naturales, muchas de las cuales se describen, o citan de otro modo, en la presente invención. Concretamente, muchas bases no naturales se describen de forma más completa en, por ejemplo, Seela y otros (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein y otros (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, y Seela y otros (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. A modo de ejemplo adicional, se incluyen opcionalmente algunas bases utilizadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, entre ellas se incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, Patente EEUU nº 5,990,303, titulada "SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES," ("Síntesis de nucleótidos 7-deaza-2'-desoxiguanosina") publicada el 23 de noviembre de 1999 y concedida a Seela. Como otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares. En algunos casos, el término "Base" abarca bases protegidas en las que las aminas exocíclicas se modifican con grupos protectores.

Un "nucleósido" se refiere a un componente de un ácido nucleico que comprende una base o grupo básico (que comprende, por ejemplo, al menos un anillo homocíclico, al menos un anillo heterocíclico, al menos un grupo arilo, y/o similares) unidos covalentemente a una fracción azúcar (por ejemplo, un azúcar ribosa, etc.),

- a un derivado de una fracción azúcar, o a un equivalente funcional de una fracción azúcar (por ejemplo, un análogo, como por ejemplo un anillo carbocíclico). Por ejemplo, cuando un nucleósido incluye una fracción azúcar, la base se une típicamente a una posición 1' de la fracción azúcar. Tal como se ha descrito más arriba, la base puede ser una base natural (por ejemplo, una base purina, tal como la adenina (A) o la guanina (G), una base pirimidina, tal como la timina (T), la citosina (C) o el uracilo (U)), o una base no natural (por ejemplo, una base 7-deazapurina, una base pirazolo[3,4-d]pirimidina, una base propinil-dN, etc.). Como nucleósidos ejemplares se incluyen los ribonucleósidos, los desoxribonucleósidos, los nucleósidos carbocíclicos etc.
- 5
- 10 Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster fosfato de un nucleósido. Por ejemplo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3 o más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de una fracción azúcar del nucleósido (por ejemplo, nucleósido polifosfatos).
- 15 Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos nucleótidos, típicamente más de tres nucleótidos, y más típicamente más de diez nucleótidos. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende generalmente de diversos factores, incluyendo la función o uso final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y digestión de restricción de las secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método como el método fosfotriéster de Narang y otros (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99; el método fosfodiéster de Brown y otros (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151; el método dietilfosforamidita de Beaucage y otros (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; el método triéster de Matteucci y otros (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191; métodos de síntesis automatizados, o el método en soporte sólido de la Patente EEUU nº 4.458.066, entre otros métodos conocidos en la técnica.
- 20
- 25 Un "cebador" es típicamente un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico molde y permitir la extensión o alargamiento de la cadena utilizando, por ejemplo, un biocatalizador incorporador de nucleótidos, tal como una polimerasa termoestable bajo unas condiciones de reacción adecuadas. Un ácido nucleico cebador es típicamente un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo, un oligodesoxirribonucleótido de cadena simple, etc.). Aunque opcionalmente se utilizan otras longitudes de ácido nucleico cebador, típicamente oscilan entre 15 y 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos utilizan temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos molde. Un ácido nucleico cebador que es al menos parcialmente complementario a una subsecuencia del ácido nucleico molde es típicamente suficiente para hibridar con el ácido nucleico molde para que se produzca la extensión. Los ácidos nucleicos cebadores pueden marcarse, si se desea, incorporando un marcador detectable mediante, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas o químicas. A modo de ejemplo, se incluyen como marcadores útiles los radioisótopos, los colorantes fluorescentes, los reactivos electro-densos, los enzimas (tal como se utilizan habitualmente en los ELISAs), la biotina, o haptenos y proteínas de los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de estos y otros marcadores se describen con mayor detalle en la presente invención y/o son conocidos de otro modo
- 30
- 35 en la técnica. Además, un ácido nucleico cebador puede simplemente proporcionar el sustrato para un biocatalizador incorporador de nucleótidos de forma independiente del molde.
- 40
- 45 Un "ácido nucleico molde" se refiere a un ácido nucleico al cual puede hibridarse un ácido nucleico cebador y ser extendido. Por lo tanto, los ácidos nucleicos molde incluyen subsecuencias que son al menos parcialmente complementarias a los ácidos nucleicos cebador. Los ácidos nucleicos molde pueden derivarse esencialmente de cualquier fuente. A modo de ejemplo, los ácidos nucleicos molde opcionalmente se derivan o aíslan a partir de, por ejemplo, microorganismos en cultivo, microorganismos no cultivados, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, sueros o tejidos agrupados, consorcios multiespecies, restos biológicos antiguos, fosilizados u otros restos biológicos no vivos, muestras medioambientales, suelos, aguas subterráneas, instalaciones de residuos, ecosistemas de los fondos marinos, o similares. Además, los ácidos nucleicos molde incluyen o se derivan, opcionalmente, de, por ejemplo, moléculas individuales de ADNc, grupos de ADNc clonados, bibliotecas de ADNc, ARNs extraídos, ARNs naturales, ARNs transcritos in vitro, ADNs genómicos caracterizados o no caracterizados, ADNs genómicos clonados, bibliotecas de ADN genómico, ADNs o ARNs fragmentados enzimáticamente, ADNs o ARNs fragmentados químicamente, ADNs o ARNs fragmentados físicamente, o similares. Los ácidos nucleicos molde también pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas en la técnica. Además, los ácidos nucleicos molde se corresponden opcionalmente con al menos una parte de un gen o son complementarios al mismo. Tal como se utiliza en la presente invención, un "gen" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias de codificación y opcionalmente, las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Los genes también incluyen opcionalmente segmentos de ADN no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas.
- 50
- 55
- 60
- 65 Un "nucleótido extensible" se refiere a un nucleótido al cual puede añadirse o unirse covalentemente al menos otro nucleótido, por ejemplo en una reacción catalizada por un biocatalizador una vez que el nucleótido extensible es incorporado en un polímero de nucleótidos. Como ejemplos de nucleótidos

extensibles se incluyen los desoxirribonucleótidos y los ribonucleótidos, y derivados de los mismos que poseen, por ejemplo, marcadores. Un nucleótido extensible se extiende típicamente añadiendo otro nucleótido en una posición 3' de la fracción azúcar del nucleótido extensible.

5 Un nucleótido "no extensible" o "terminador" se refiere a un nucleótido, que tras ser incorporado a un ácido nucleico evita o reduce substancialmente la velocidad de extensión del ácido nucleico por, por ejemplo, al menos un biocatalizador incorporador de nucleótidos.

10 Un "nucleótido tetrafosfato" se refiere a un nucleótido que incluye cuatro grupos fosfato. Como nucleótidos tetrafosfato ejemplares se incluyen los nucleósidos 2'-monofosfato-5'-trifosfato y los nucleósidos 3'-monofosfato-5'-trifosfato.

15 Un "grupo bloqueador con carga negativa" se refiere a un grupo bloqueador que comprende al menos una carga negativa, contribuyendo dicha carga negativa al menos a la propiedad de no extensibilidad del nucleótido al que está unida, por ejemplo, mediante repulsión electrostática de los nucleótidos entrantes. A modo de ejemplo, los grupos bloqueantes con carga negativa en la posición 2' de los nucleótidos incluyen, opcionalmente, los grupos fosfato, carboxi y otros grupos citados en la presente invención que comprenden al menos una carga negativa tras su ionización a un pH de orden fisiológico. En algunas realizaciones, pueden contribuir a la propiedad de no extensibilidad de un nucleótido de la invención, múltiples factores, por ejemplo, 20 el tamaño y la carga del grupo bloqueador.

25 Una "secuencia completa" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende al menos substancialmente el mismo número de nucleótidos que una secuencia de referencia o una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de referencia. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, un ácido nucleico cebador extendido es complementario a la secuencia completa de un ácido nucleico molde u otra secuencia de referencia.

30 Una "subsecuencia" o "fragmento" se refiere a una parte de una secuencia de ácidos nucleicos de forma que la subsecuencia comprende nucleótidos contiguos de la secuencia.

35 Un "genotipo" se refiere a toda o parte de la constitución genética de una célula o individuo o grupo de células o de individuos. Por ejemplo, un genotipo incluye las mutaciones y/o alelos particulares (por ejemplo, polimorfismos, tales como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o similares) presentes en un locus determinado o distribuidos por el genoma.

El término "unido" o "enlazado" se refiere a interacciones que incluyen, sin carácter limitante, las uniones covalentes, las uniones iónicas, la quimisorción, la fisorción y combinaciones de las mismas.

40 Un "enlazador" o "separador" se refiere a una fracción química que une de forma covalente o no covalente (por ejemplo, de forma iónica, etc.) a un compuesto o grupo sustituyente a, por ejemplo, un soporte sólido, otro compuesto o grupo o similares. Por ejemplo, un enlazador une, opcionalmente, un marcador (por ejemplo un colorante fluorescente, un radioisótopo, etc.) a un nucleótido terminador en 2' o similar. Los enlazadores son típicamente fracciones químicas bifuncionales y, en algunas realizaciones comprenden uniones escindibles, las cuales pueden ser escindidas mediante, por ejemplo, calor, un enzima, un agente químico, radiaciones electromagnéticas, etc. para liberar materiales o compuestos de, por ejemplo, un soporte sólido, otro compuesto etc. Una selección cuidadosa del enlazador permite que la escisión se lleve a cabo bajo condiciones adecuadas compatibles con la estabilidad del compuesto y método de ensayo. En general, el enlazador carece de actividad biológica específica diferente a, por ejemplo, unir grupos químicos o conservar una distancia mínima u otra relación espacial entre dichos grupos. Sin embargo, los constituyentes del enlazador pueden seleccionarse para influenciar alguna propiedad de los grupos químicos unidos tales como la conformación tridimensional, la carga neta, la hidrofobicidad, etc. En, por ejemplo, Lyttle y otros (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(14):2793, Shchepino y otros (2001) *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* 20:369, Doronina y otros (2001) *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* 20:1007, Trawick y otros (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:900, Olejnik y otros (1998) *Methods in Enzymology* 291:135, Pljevaljcic y otros (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125(12):3486, Ward, y otros, Patente EEUU nº 4.711.955, Stavrianopoulos, Patente EEUU nº 4.707.352, y Stavrianopoulos, Patente EEUU nº 4.707.440 se proporcionan descripciones adicionales de moléculas enlazadoras.

60 Un "marcador" se refiere a una fracción unida (de forma covalente o no covalente) o capaz de unirse, a una molécula, proporcionando o siendo capaz de proporcionar dicha fracción información sobre la molécula (por ejemplo, información descriptiva, identificadora, etc., sobre la molécula). Como marcadores ejemplares se incluyen marcadores fluorescentes, marcadores fluorescentes débiles, marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radioactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos y enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.). A modo de ejemplo adicional, entre los marcadores 65

también se incluyen las fracciones informadoras y desactivadoras.

Un "soporte sólido" se refiere a un material sólido que puede ser derivatizado con una fracción química o fijado a la misma, tal como un ácido nucleico cebador, un ácido nucleico plantilla o similar. Como ejemplos de soportes sólidos se incluyen placas, perlas, microperlas, fibras, mechones, peines, chips de hibridación, membranas, monocristales, capas cerámicas, monocapas autoensambladas, y similares.

La expresión "en solución" se refiere a una condición de reacción en la que al menos los reactivos no están unidos a un soporte sólido. Por ejemplo, algunas reacciones de extensión de la presente invención incluyen la incubación de los ácidos nucleicos molde, los ácidos nucleicos cebadores, los nucleótidos terminadores en 2', los nucleótidos extensibles y los biocatalizadores incorporadores de nucleótidos conjuntamente en solución.

El término "escisión" se refiere a un proceso de liberación de un material o compuesto a partir de otro compuesto o material o a partir de un soporte sólido para permitir, por ejemplo, el análisis del compuesto mediante métodos en fase de solución. Ver, por ejemplo Wells y otros (1998) "Cleavage and Analysis of Material from Single Resin Beads," ("Escisión y análisis de materiales a partir de perlas de resina individuales") J. Org. Chem. 63:6430-6431.

Introducción

La presente invención da a conocer, por ejemplo, un método para determinar una secuencia de ácidos nucleicos utilizando un nucleótido modificado en 2' que sirve como terminador reversible. En algunas realizaciones, la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' dentro de una cadena de ácido nucleico que está siendo alargada da lugar a una señal detectable. En algunas realizaciones ejemplares, las señales detectables se producen tras la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2', por ejemplo, cuando se elimina la modificación de la posición 2'. Además, el tratamiento del nucleótido incorporado con una actividad para eliminar la modificación proporciona la posibilidad de la extensión adicional de la cadena de ácido nucleico.

Nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2'

Algunos nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' son conocidos en la técnica. Dichos nucleótidos se describen, por ejemplo en las publicaciones de solicitud de patente EEUU nº 20050037991 y 20050037398. Los nucleótidos terminadores pueden poseer bases naturales o análogos de dichas bases. Además, el término incluye análogos de nucleótidos tales como los análogos 5'-trifosfato, 5'-tetrafosfato y 5'-pentafosfato.

Los nucleótidos modificados de la presente invención presentan una modificación en la posición 2' del azúcar, denominada en la presente invención como grupo bloqueador, que inhibe la extensión de la cadena de nucleótidos. La modificación en la posición 2' del azúcar en los nucleótidos terminadores puede ser cualquier tipo de grupo bloqueador, por ejemplo, un grupo bloqueador con carga negativa, un grupo bloqueador voluminoso y similares, que se incorporan a la posición 2' de la fracción azúcar. El grupo bloqueador de los nucleótidos terminadores utilizados en la presente invención es eliminable, por ello, los terminadores son terminadores reversibles. El grupo bloqueador puede ser eliminado mediante medios enzimáticos, químicos u otros.

El grupo bloqueador puede eliminarse mediante, por ejemplo, medios enzimáticos, químicos o fotoquímicos. Como ejemplos de enlaces escindibles se incluyen enlaces que pueden ser escindidos por enzimas, luz, agentes reductores, agentes oxidantes, agentes hidratantes y similares.

En algunas realizaciones, la modificación 2' es un fosfato. Consiguientemente, la modificación 2' es fácilmente eliminable utilizando una actividad que elimina fosfatos. Frecuentemente, la actividad es una actividad enzimática, por ejemplo, una fosfatasa, una exonucleasa III, una endonucleasa IV o una polinucleótido quinasa. En algunos casos, por ejemplo, en los que el marcador está unido al fosfato 2', pueden utilizarse para eliminar el grupo fosfato, fosfodiesterasas, solas o en combinación con una fosfatasa. Ello puede llevarse a cabo mediante la incorporación de enlaces fosforotioato para evitar la degradación del esqueleto del ácido nucleico.

En otras realizaciones, tal como también se ha descrito más arriba, el grupo bloqueador se une a la posición 2' mediante un enlace que puede escindirse enzimáticamente, químicamente (por ejemplo, agentes reductores, agentes oxidantes, agentes hidratantes o similares) o mediante un enlace fotoescindible. Las fracciones fotoescindibles que pueden utilizarse incluyen las fracciones 2-nitrobencilo, las fracciones 2-nitrobencilo con sustituciones en posición alfa (por ejemplo, fracciones 1-(2-nitrofenil)etilo), fracciones 3,5-dimetoxibencilo, el ácido tiohidroxámico, fracciones 7-nitroindolino, fracciones 9-fenilxantilo, fracciones benzoino, fracciones hidroxifenacilo, fracciones NHS-ASA, y similares. Los enlazadores fotoescindibles se

describen con mayor detalle en, por ejemplo, la publicación de patente EEUU nº 2003/0099972.

También pueden utilizarse enlazadores escindibles químicamente para unir el grupo bloqueador a la posición 2'. Se incluyen como agentes escindibles agentes químicos, tales como agentes reductores que escinden enlaces disulfuro presentes en los enlazadores. Puede utilizarse cualquier modificación química que sea reversible bajo condiciones que no sean perjudiciales para el ácido nucleico. Por lo tanto, son adecuadas aquellas modificaciones químicas que puedan ser fácilmente revertidas utilizando bases o ácidos débiles, agentes reductores, oxidantes débiles, calor, catalizadores, etc. Por ejemplo, con las sustituciones adecuadas, pueden actuar como modificadores químicamente reversibles ésteres, éteres alilo, éteres tritilo y éteres bencilo.

En algunas realizaciones, el grupo bloqueador se selecciona entre los mostrados en la Figura 1. Estos grupos bloqueadores pueden eliminarse utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, los grupos bloqueadores mostrados en la Figura 1A pueden eliminarse, por ejemplo, enzimáticamente, o con un ácido débil o calor cuando X=NH. Los grupos bloqueadores mostrados a modo de ejemplo en la Figura 1B pueden eliminarse, por ejemplo, mediante tratamiento con el ion flúor. Los grupos bloqueadores mostrados a modo de ejemplo en la figura 1C, tales como el tritilo o el tritilo sustituido, pueden eliminarse, por ejemplo con un ácido débil o calor. Las modificaciones mostradas a modo de ejemplo en la figura 1D pueden eliminarse, por ejemplo, mediante escisión del enlace disulfuro utilizando agentes reductores. Las modificaciones 2' mostradas en la figura 1E pueden eliminarse, por ejemplo, utilizando paladio (ver, por ejemplo, Turro y otros). Los grupos bloqueadores en 2' mostrados a modo de ejemplo en la figura 1F pueden eliminarse utilizando agentes tales como esterases, proteasas, o tratamiento con ácidos o bases débiles y similares. Las modificaciones 2' como las mostradas en la figura 1G pueden eliminarse, por ejemplo, fotoquímicamente. Los grupos bloqueadores como los mostrados en la figura 1H pueden eliminarse, por ejemplo, mediante reducción catalítica.

Los nucleótidos terminadores modificados en 2' se sintetizan típicamente utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, en la publicación de patente EEUU nº 20050037991 se proporcionan protocolos ejemplares de síntesis.

30 Marcadores

Fracciones marcadores

En algunas realizaciones, los nucleótidos terminadores modificados en 2' de la presente invención comprenden un marcador o componentes de un sistema marcador para permitir la detección de la incorporación del nucleótido a la molécula de ácido nucleico. La señal puede generarse en base a una estrategia de marcado en la que la señal se detecta tras la incorporación del nucleótido a la cadena, o cuando se elimina el grupo bloqueador del nucleótido modificado en 2' añadido a la cadena de ácido nucleico. Dicho marcador permite la generación de una señal que indica si se ha incorporado un nucleótido a la cadena de ácido nucleico. El concepto de generación de señal indicativa de si se ha incorporado un nucleótido incluye tanto la señalización directa como la señalización indirecta y la generación de una señal que se produce mientras se incorpora el nucleótido, por ejemplo, la eliminación del fosfato gamma da lugar a una señal o una situación en la que se incluye una etapa adicional tras la incorporación para detectar el nucleótido incorporado, por ejemplo, una etapa que elimina el grupo bloqueador en el grupo 2'OH o realizaciones que utilizan la escisión lumínica o química del enlazador ubicado en la base.

Un nucleótido terminador modificado en 2' puede marcarse con cualquier marcador detectable que genere una señal, incluyendo, marcadores radioactivos, grupos modificadores de masa, fracciones fluorescentes, fracciones luminiscentes, fracciones enzimáticas y similares. En las realizaciones típicas, el marcador es un marcador fluorescente.

En el contexto de la presente invención, el término marcador también se refiere a un sistema de marcado en el que interactúan entre sí múltiples fracciones, por ejemplo un par de fracciones, para controlar la generación de la señal. Ello incluye, por ejemplo, pares dador/aceptor en los que la emisión fluorescente del dador provoca la excitación del aceptor cuando las moléculas se hallan próximas entre sí. Por consiguiente, la señal generada por el dador y/o el aceptor es diferente cuando las dos moléculas están separadas entre si en comparación con la generada cuando las moléculas se hallan próximas. Una fracción dadora, típicamente un fluoróforo, absorbe energía en una primera longitud de onda y emite en una segunda longitud de onda más larga. El término aceptor se refiere a otra fracción, tal como un fluoróforo, un cromóforo o un desactivador que posee un espectro de absorción que se superpone con el espectro de emisión del dador. La eficiencia de la transferencia de energía entre el dador y el aceptor depende, por ejemplo, de la superposición entre los espectros de emisión del dador y los espectros de absorción del aceptor y de la distancia entre el dador y el aceptor.

Las fracciones fluorescentes que pueden utilizarse como marcadores son generalmente conocidas por los

expertos en la técnica. Entre ellas se incluyen los colorantes de la familia de la fluoresceína (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), los colorantes de la familia de la polihalofluoresceína (ABI, Foster City, CA), los colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína (ABI, Foster City, CA), los colorantes de la familia de la cumarina (Invitrogen- Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), los colorantes de la familia de la rodamina (GE Healthcare), los colorantes de la familia de la cianina, los colorantes de la familia de la oxazina, los colorantes de la familia de la tiazina, los colorantes de la familia de la escuaraina, los colorantes de la familia de la lantanida quelada, los colorantes de la familia BODIPI® (Molecular Probes, Inc.). Pueden hallarse otros ejemplos de fracciones fluorescentes en las Patentes EEUUⁿ 6.406.297; 6.221.604; 5.994.063; 5.808.044; 5.880.287; 5.556.959 y 5.135.717. Se incluyen como marcadores detectables adicionales que se utilizan opcionalmente, por ejemplo, la dimetilacridinona (DDAO), 4-metilumbeliferona, 6,8-difluoro-4-metilumbeliferona, y similares. Tal como se ha mencionado anteriormente, las fracciones fluorescentes que pueden utilizarse como marcadores están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Invitrogen-Molecular Probes (Eugene, OR), entre muchos otros.

En algunas realizaciones, los nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' están marcados con un par fluorescente-desactivador (por ejemplo, un par dador-aceptor). Las fracciones desactivadoras incluyen, por ejemplo, colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, los colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuaraina, colorantes de la familia de la lantanida quelada, colorantes de la familia BODIPI®, fracciones desactivadoras de baja fluorescencia y fracciones desactivadoras no fluorescentes. En algunas realizaciones, las fracciones desactivadoras no fluorescentes pueden ser colorantes de la familia BHQ™ (incluyendo los desactivadores descritos en WO 01/86001, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3) (BioSearch Technologies, Novato, CA), o Dabcyl (Integrated DNA Technologies, Inc.). Otros ejemplos de fracciones desactivadoras específicas son, por ejemplo, TAMRA (N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxyrodamina) (Invitrogen-Molecular Probes, Inc.), DABCYL (ácido 4 (4' dimetilaminofenilazo)benzoico), Iowa Black™ (Integrated DNA Technologies, Inc.), Cy3™, Cy3,5™, Cy5™, o Cy5,5™ (GE Healthcare), y similares. Son combinaciones ejemplares de fracciones fluorescentes y desactivadoras que también se utilizan, por ejemplo, una fracción fluorófora 6-carboxifluoresceína (FAM), una fracción desactivadora Cy5™; una fracción fluorófora seleccionada del grupo formado por FAM, TET, JOE, HEX, Oregon Green y una fracción desactivadora BHQ-1, una fracción fluorófora seleccionada del grupo formado por FAM, TAMRA, ROX, Cy3, Cy3,5, CAL Red, Red 640 y una fracción desactivadora BHQ-2; una fracción fluorófora seleccionada del grupo formado por Cy5 y Cy5,5 y una fracción desactivadora BHQ-3.

Sitio de unión del marcador

El marcador (o componentes del marcador) pueden unirse a cualquier sitio adecuado para detectar el nucleótido terminador reversible modificado en 2' que se incorpora a la cadena de ácido nucleico. La unión del marcador al nucleótido también permite la eliminación de la señal, de manera que la señal del marcador que se incorpora a la cadena de ácido nucleico puede ser eliminada. Por ejemplo, en situaciones en la que se une un marcador individual al nucleótido terminador modificado en 2', el marcador puede unirse a la base o el azúcar a través de un enlazador. Una vez se ha detectado la señal del marcador incorporado a la cadena de ácido nucleico extendida, el marcador puede ser eliminado mediante escisión del enlazador. En otras realizaciones, la fracción de marcado se une a un fosfato presente en la posición 2' modificada. La fracción de marcado puede entonces ser eliminada, por ejemplo, mediante una fosfodiesterasa y/o una fosfatasa, cuando la modificación en 2' se elimina del nucleótido terminador modificado en 2'.

Cuando se utiliza más de un componente en el sistema de marcado, los componentes están unidos a los sitios adecuados del nucleótido terminador modificado en 2'. Por ejemplo, el sistema de marcado puede incluir un par dador-aceptor, tal como una molécula informadora de colorante fluorescente y un desactivador. Los ejemplos comentados en esta sección utilizan un informador fluorescente y un desactivador como componentes ejemplares del marcado. Se entiende en la técnica que pueden utilizarse configuraciones de marcado similares para otros sistemas de marcado con componentes múltiples.

En algunas realizaciones, el nucleótido terminador reversible modificado en 2' puede poseer una fracción desactivadora unida a la base o el azúcar y un informador unido al fosfato. Típicamente, el fosfato en cualquier fosfato del nucleótido que no sea un fosfato alfa. Por consiguiente, el informador puede situarse en la posición 2' del azúcar unido al grupo modificador fosfato en 2'. En otras realizaciones, el informador está unido preferentemente a un fosfato gamma. El informador también puede unirse a un fosfato beta, y en realizaciones en las que se utiliza un nucleótido terminado modificado en 2' con un tetrafosfato o un pentafosfato, el informador también puede unirse a uno de los fosfatos adicionales.

En algunas realizaciones, también puede ser deseable utilizar configuraciones alternativas. Por ejemplo, un informador fluorescente puede unirse a una base de un nucleótido terminador modificado en 2' mediante un enlazador escindible y el desactivador puede unirse a un fosfato. Dicha configuración puede ser útil, por

ejemplo, en los casos en que una reacción de secuenciación de la invención utiliza cuatro nucleótidos terminadores modificados en 2', cada uno de ellos marcado con un informador fluorescente de color diferente. El desactivador se encuentra en el fosfato beta o gamma, por consiguiente, los cuatro análogos están presentes, pero producen una señal débil o no producen señal. Tras la incorporación de uno de los análogos a la cadena de ácido nucleico, puede detectarse la señal del nucleótido incorporado. Tras la eliminación del colorante mediante la escisión del enlazador escindible, se elimina el grupo bloqueador en 2'.

En otras realizaciones, una fracción de marcado, por ejemplo un informador fluorescente o un desactivador, está unida a un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador modificado en 2' y una segunda fracción de marcado, el informador o desactivador correspondiente, dependiendo de la identidad de la primera fracción de marcado, está unida a un segundo fosfato que no sea un fosfato alfa, por ejemplo un fosfato gamma o beta, o a otras posiciones fosfato en los nucleótidos terminadores modificados en 2' con tetrafosfato o pentafofosfato.

Los marcadores pueden unirse a los nucleótidos terminadores modificados en 2' utilizando técnicas conocidas. Son enlaces escindibles ejemplares aquellos que pueden ser escindidos mediante luz, agentes reductores, agentes oxidantes, agentes hidratantes y similares. Se describen ejemplos en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente EEUU nº 20050037398.

También se utilizan enlazadores no escindibles para, por ejemplo, unir un informador a un fosfato gamma o beta u otra fracción, por ejemplo, un grupo bloqueador en el nucleótido modificado, que se elimina durante la síntesis o una vez el nucleótido modificado se incorpora a la cadena de ácido nucleico. Dichas uniones utilizan técnicas conocidas.

En la técnica se encuentran fácilmente disponibles directrices para la unión a marcadores u otras moléculas orgánicas (ver, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques* ("Técnicas de bioconjugación"), (1996) Academic Press, San Diego, Calif. pp. 40-55, 643-71 Garman; 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach* ("Marcaje no radioactivo: Un enfoque práctico"), Academic Press, London.; Beaucage y otros, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* ("Protocolos en la química de ácidos nucleicos"), John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2000); *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* ("Manual de sondas fluorescentes y productos de investigación"), 9ª ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. (2002); y *Pierce Applications Handbook and Catalog 2003-2004* "Catálogo y manual de aplicaciones de Pierce", Pierce Biotechnology, Rockford, Ill. (2003).

Reacción de secuenciación utilizando nucleótidos terminadores modificados en 2'

Las reacciones que utilizan los nucleótidos terminadores reversibles en 2' de la presente invención incluyen una etapa de eliminación del grupo modificador en 2' para revertir la terminación del alargamiento de la cadena. Por lo tanto, la presente invención permite la monitorización en tiempo real de una cadena de ácido nucleico que está siendo alargada en una reacción de extensión. Dicha reacción de secuenciación puede realizarse en varios formatos.

En una realización, los cuatro nucleótidos (término que incluye los análogos de los nucleótidos naturales dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) están presentes como nucleótidos terminadores modificados en 2', cada uno de ellos marcado con un marcador distinguible. La incorporación de un nucleótido concreto puede detectarse, por ejemplo, utilizando un sistema informador fluorescente/desactivador. Una vez se ha incorporado el nucleótido, la señal puede eliminarse. La modificación bloqueadora en posición 2' también se elimina permitiendo la continuación del alargamiento de la cadena.

En las realizaciones típicas, las etapas de secuenciación se realizan de forma secuencial utilizando un nucleótido terminador modificado en 2' cada vez. En este método, se incluye un terminador modificado en 2' en la mezcla de reacción que comprende el ácido nucleico molde, un cebador adecuado, una polimerasa y otros componentes de la reacción. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones en las que el cebador se hibride al ácido nucleico molde y pueda extenderse. Se monitoriza la incorporación del terminador modificado en 2'. Si se incorpora el nucleótido, se detecta una señal y se elimina la modificación en 2' para permitir la continuación del alargamiento. En algunas realizaciones, la señal se detecta antes o de forma concurrente con la eliminación de la modificación en 2'. Si el terminador modificado no se incorpora, se utiliza un segundo terminador modificado en 2' (correspondiente a una base diferente). Esta etapa se repite hasta que se detecta la incorporación de uno de los cuatro nucleótidos modificados en 2'. Tras la eliminación del grupo modificador, se interroga la siguiente posición del ácido nucleico molde utilizando el mismo análisis secuencial.

En las realizaciones, en las que los cuatro nucleótidos se añaden secuencialmente, éstos pueden estar marcados con el mismo marcador o con marcadores diferentes.

La incorporación del nucleótido terminador modificado en 2' puede detectarse mediante cualquiera de diversos métodos. En algunas realizaciones, la incorporación del nucleótido se determina mediante la detección del pirofosfato liberado en el momento de la incorporación del nucleótido, como ocurre en la pirosecuenciación. La secuenciación por síntesis utilizando una detección basada en pirofosfato se ha descrito en la Patente EEUU nº 4.971.903 y Hyman, Anal. Biochem. 174:423 (1988); Rosenthal, Publicación de solicitud de patente internacional 761107 (1989); Metzker y otros, Nucl. Acids Res. 22:4259 (1994); Jones Biotechniques 22:938 (1997); Ronaghi y otros, Anal. Biochem. 242:84 (1996), Nyren y otros, Anal. Biochem. 151:504 (1985). La detección de la actividad ATP sulfurilasa se describe, por ejemplo, en Karamohamed y Nyren, Anal. Biochem. 271:81 (1999). Estos métodos se basan en la detección del pirofosfato (PPi) liberado durante la reacción de la ADN polimerasa. Al añadir nucleotriposfosatos a la cadena de ácido nucleico que está creciendo, se libera PPi. Esto puede medirse cuantitativamente mediante la conversión de PPi en ATP mediante el enzima sulfurilasa, y la producción subsiguiente de luz por la luciferasa de luciérnaga. Se han descrito diversos sistemas de ensayo basado en este mecanismo (ver, por ejemplo, WO93/23564, WO 98/28440 y WO98/13523; y Ronaghi y otros, Science 281:363 (1998)).

En otras realizaciones, la incorporación puede detectarse, por ejemplo, detectando la presencia de cualquier marcador, como, por ejemplo, un marcador fluorescente. El método de detección que se utiliza, se selecciona según el marcador. Por lo tanto, la etapa de detección puede detectar la emisión de luz, radioactividad o similares.

En algunas realizaciones, el análisis de secuencias, según la invención, puede realizarse mediante diversas aplicaciones en las que es deseable determinar la secuencia de una o más posiciones de un ácido nucleico. Estas aplicaciones incluyen la re-secuenciación, el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), el haplotipado molecular, la determinación de la frecuencia alélica, el análisis de metilación y la detección de genotipos mezclados.

Por ejemplo, el genotipado puede realizarse en etapas secuenciales incubando un ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa y un nucleótido terminador modificado en 2'. El cebador se diseña para dirigirse a una región concreta de un ácido nucleico. La reacción se monitoriza para determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del terminador modificado en 2'. Si no está presente, se lleva a cabo una etapa subsiguiente utilizando un nucleótido terminador modificado en 2' diferente, es decir que tiene una base diferente. Una vez se incorpora el nucleótido modificado, en 2' el grupo modificador se elimina para permitir la continuación del alargamiento de la cadena.

Se entiende que en algunas aplicaciones, puede no ser necesario interrogar la secuencia molde utilizando nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' correspondientes a las cuatro bases naturales. Por ejemplo, en aplicaciones de resecuenciación en las que se quiere resecuenciar un tramo homopolimérico de nucleótidos para determinar el número de residuos, pueden realizarse ciclos repetidos con solamente un terminador reversible modificado en 2', complementario a la base repetida en el trozo homopolimérico.

La reacción de secuenciación puede llevarse a cabo en cualquier tipo de formato. Por ejemplo, la reacción puede realizarse en solución. En otras realizaciones, la reacción se realiza en una fase sólida, tal como una micromatriz o una micropelota, en la que el ADN molde se asocia con un soporte sólido. Como tipos de soporte sólido útiles se incluyen las placas, perlas, micropelotas, mechones, fibras, peines, chips de hibridación, membranas, monocristales, cerámicas y monocapas autoensambladas. Los ácidos nucleicos pueden unirse al soporte sólido mediante unión covalente, como por ejemplo mediante conjugación con un agente acoplador, o mediante unión no covalente, como por ejemplo por interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o acoplamientos anticuerpo-antígeno o combinaciones de las mismas. Existe una amplia variedad de métodos conocidos para unir ácidos nucleicos a soportes sólidos. Ver, por ejemplo, las solicitudes PCT nº US98/21193, PCT US99/14387 y PCT US98/05025; y WO98/50782.

Un ácido nucleico molde puede unirse directamente a la superficie a través de su extremo 5' o 3'. El molde también puede unirse mediante un oligonucleótido, por ejemplo un oligonucleótido cebador. Por ejemplo, en algunas aplicaciones, puede ser deseable realizar la reacción de secuenciación sobre un formato de micromatriz en la que un oligonucleótido cebador unido a la superficie se hibrida y se reticula con el molde. Alternativamente, la hibridación del molde a un oligonucleótido también puede realizarse en solución, seguida de la unión a un soporte sólido mediante, por ejemplo, un enlazador presente en el oligonucleótido cebador. Dado que la matriz está formada por posiciones discretas y resolubles, cada polinucleótido diana presente generará una serie distintiva de señales indicativa de la incorporación de nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2'. Pueden utilizarse diversos formatos de micromatriz, incluyendo formatos de micromatriz de una sola molécula como los descritos en la Patente EEUU nº 6.787.308 y la publicación de solicitud de patente EEUU nº 20020164629. Estas referencias proporcionan directrices adicionales ejemplares sobre la unión de ácidos nucleicos a superficies sólidas.

La determinación de la secuencia puede realizarse añadiendo nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferente, por ejemplo, nucleótidos terminadores correspondientes a cada una de las cuatro bases naturales, de forma simultánea o secuencial. Por ejemplo, cuando los nucleótidos se añaden simultáneamente, un nucleótido terminador añadido que se empareja con el nucleótido presente en el ADN molde se incorpora a la cadena y detiene el crecimiento de la misma. El grupo bloqueador en 2' se elimina para permitir el alargamiento adicional de la cadena. La detección puede llevarse a cabo o bien cuando se incorpora el nucleótido en la cadena o en una etapa subsiguiente, por ejemplo, cuando se elimina el grupo bloqueador, o cuando se elimina el marcador presente en una base a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el grupo bloqueador en 2' puede eliminarse con un tampón o un lavado que también elimina los nucleótidos no incorporados.

En otras realizaciones, los nucleótidos se añaden de forma secuencial.

Sistemas

La presente invención también da a conocer un sistema para determinar la secuencia de un ácido nucleico. Dicho sistema incluye al menos un contenedor que comprende un nucleótido terminador reversible en 2'. Típicamente, el sistema comprende una serie de contenedores para, por ejemplo, llevar a cabo las reacciones de determinación de secuencia en paralelo. El sistema también incluye al menos un modulador térmico (por ejemplo, un dispositivo de termociclado, etc.) conectado operativamente al contenedor para modular la temperatura en el mismo, y/o (c) al menos un componente de la transferencia de fluidos (por ejemplo una pipeta automática, etc.) que transfiere el fluido hacia y/o desde el contenedor. Los dispositivos de termociclado, algunos de los cuales se integran en dispositivos de microfluídica, y diversos dispositivos de transferencia de fluidos adecuados o adaptables para ser utilizados en los sistemas de la invención son generalmente conocidos en la técnica. El sistema incluye opcionalmente al menos un detector conectado operativamente al contenedor para detectar señales detectables producidas en el contenedor. El sistema incluye típicamente además al menos un controlador conectado operativamente al modulador térmico para realizar la modulación de la temperatura en el contenedor y/o en el componente de la transferencia de fluidos que realiza la transferencia de fluidos hacia y/o desde el contenedor.

Los sistemas de la presente invención incluyen diversos detectores de señal. Los componentes de detección detectan una señal indicativa de la incorporación de un nucleótido terminador reversible en 2'. Por ejemplo, el detector opcionalmente monitoriza una serie de señales, que se corresponden en posición a resultados en "tiempo real". Las señales generadas durante las reacciones de secuenciación pueden detectarse utilizando cualquier método que pueda leer la actividad de una molécula informadora. Los detectores de señal adecuados para ser utilizados en estos sistemas detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, masa, concentración, pH, carga, absorbancia, índice de refracción, luminiscencia, temperatura, campos magnéticos, o similares. Por ejemplo, la fluorescencia es detectada opcionalmente por detectores o sensores, tales como los tubos fotomultiplicadores (PMTs), dispositivos de carga acoplada (CCDs), CCDs intensificados, fotodiodos, fotodiodos de avalancha, sensores ópticos, detectores de barrido, o similares. Se describen sistemas de detección ejemplares en, por ejemplo, Skoog y otros, *Principles of Instrumental Analysis* ("Principios de análisis instrumental"), 5.ª ed., Harcourt Brace College Publishers (1998) y Currell, *Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality* ("Instrumentación analítica: características de rendimiento y calidad"), John Wiley & Sons, Inc. (2000)). Detectores como éstos se hallan directamente disponibles a partir de diversas fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.).

Los sistemas de la invención también incluyen típicamente controladores que están conectados operativamente a uno o más componentes (por ejemplo, componentes analíticos, componentes de síntesis, modulador térmico, componentes de la transferencia de fluidos, detectores, etc.) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Los controladores se incluyen generalmente o bien como componentes separados o como componentes integrales del sistema para, por ejemplo, recibir datos desde los detectores, inducir y/u regular la temperatura en los contenedores, inducir y/o regular el flujo de fluido hacia o desde los contenedores seleccionados, o similares. Los controladores y/o otros componentes del sistema están opcionalmente acoplados a un procesador, ordenador, dispositivo digital u otro dispositivo de información adecuadamente programado (incluyendo, por ejemplo un convertidor de analógico a digital o de digital a analógico, según sea necesario), que actúa dando instrucciones operativas a dichos instrumentos, según instrucciones preprogramadas o introducidas por el usuario, recibiendo datos e información desde dichos instrumentos, e interpretando, manipulando y notificando dicha información al usuario. Los controladores adecuados son conocidos generalmente en la técnica y se hallan disponibles a partir de diversas fuentes comerciales.

Cualquier controlador u ordenador incluye opcionalmente un monitor que habitualmente es una pantalla de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla plana (por ejemplo una pantalla de cristal líquido de matriz, una pantalla de cristal líquido, etc.) u otros. Los circuitos del ordenador se sitúan habitualmente en una caja, que incluye

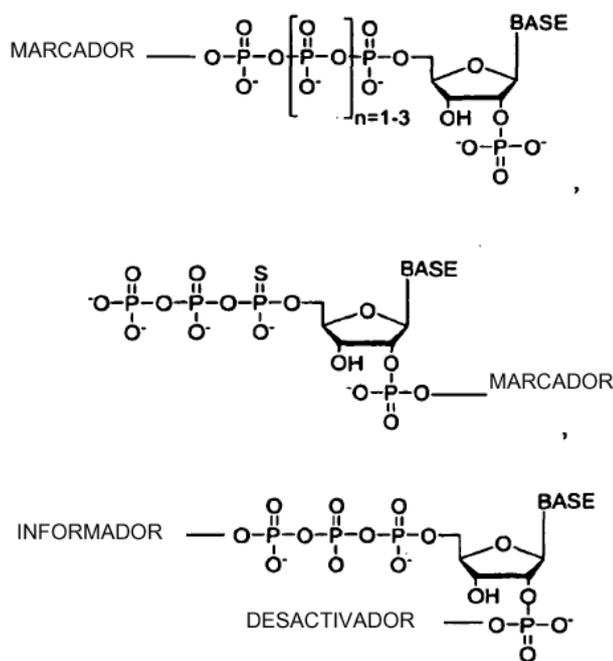
diversos chips de circuitos integrados, tales como un microprocesador, una memoria, circuitos de interfaz, y otros. La caja también incluye opcionalmente una unidad de disco duro, una unidad de diskette, una unidad extraíble de gran capacidad tal como un CD-ROM grabable y otros elementos periféricos habituales. Los dispositivos de entrada tales como un teclado o ratón se proporcionan opcionalmente para la entrada de datos por el usuario. Estos elementos se ilustran con mayor detalle a continuación.

El ordenador incluye típicamente un software adecuado para recibir las instrucciones del usuario ya sea mediante la introducción por parte del usuario en una serie de campos de parámetros, por ejemplo en una GUI, o mediante instrucciones preprogramadas, por ejemplo, la preprogramación de una serie de operaciones específicas diferentes. A continuación, el software convierte dichas instrucciones en el lenguaje adecuado para dar instrucciones de funcionamiento a uno o más controladores para llevar a cabo la operación deseada. A continuación, el ordenador recibe los datos desde, por ejemplo, los sensores/detectores incluidos en el sistema, e interpreta los datos, y o bien los proporciona en un formato comprensible para el usuario o los utiliza para iniciar instrucciones adicionales para los controladores, según la programación para, por ejemplo, controlar los reguladores del flujo de fluido en respuesta a los datos de peso del fluido recibidos desde las balanzas de peso o similares.

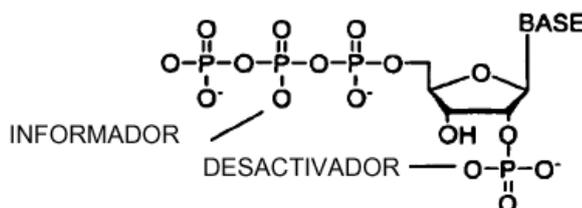
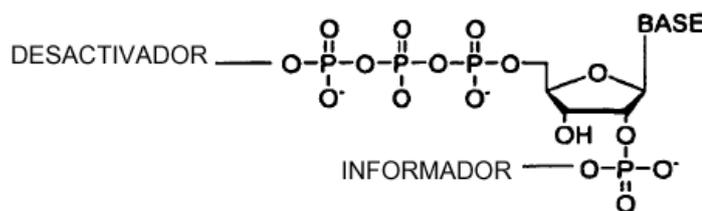
Kits

La invención también da a conocer kits para la determinación de secuencias. Dichos kits pueden incluir al menos un nucleótido terminador reversible en 2'. El nucleótido terminador en 2' incluye al menos un marcador (por ejemplo, un radioisótopo, un colorante fluorescente, un grupo modificador de la masa, o similares). En algunas realizaciones, el kit incluye adicionalmente un reactivo para eliminar la modificación bloqueadora presente en el nucleótido terminador. Los kits de la presente invención también pueden incluir componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: un nucleótido extensible, una polimerasa para realizar la reacción, tampones, o componentes enzimáticos o reactivos necesarios para detectar una señal.

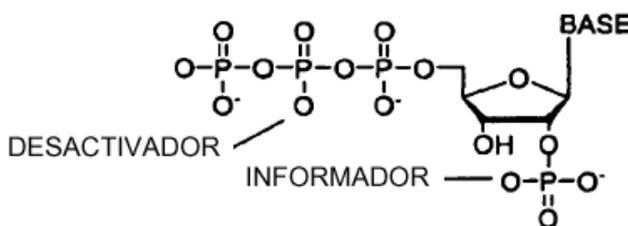
En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' tal como se especifica a continuación:



30



y/o



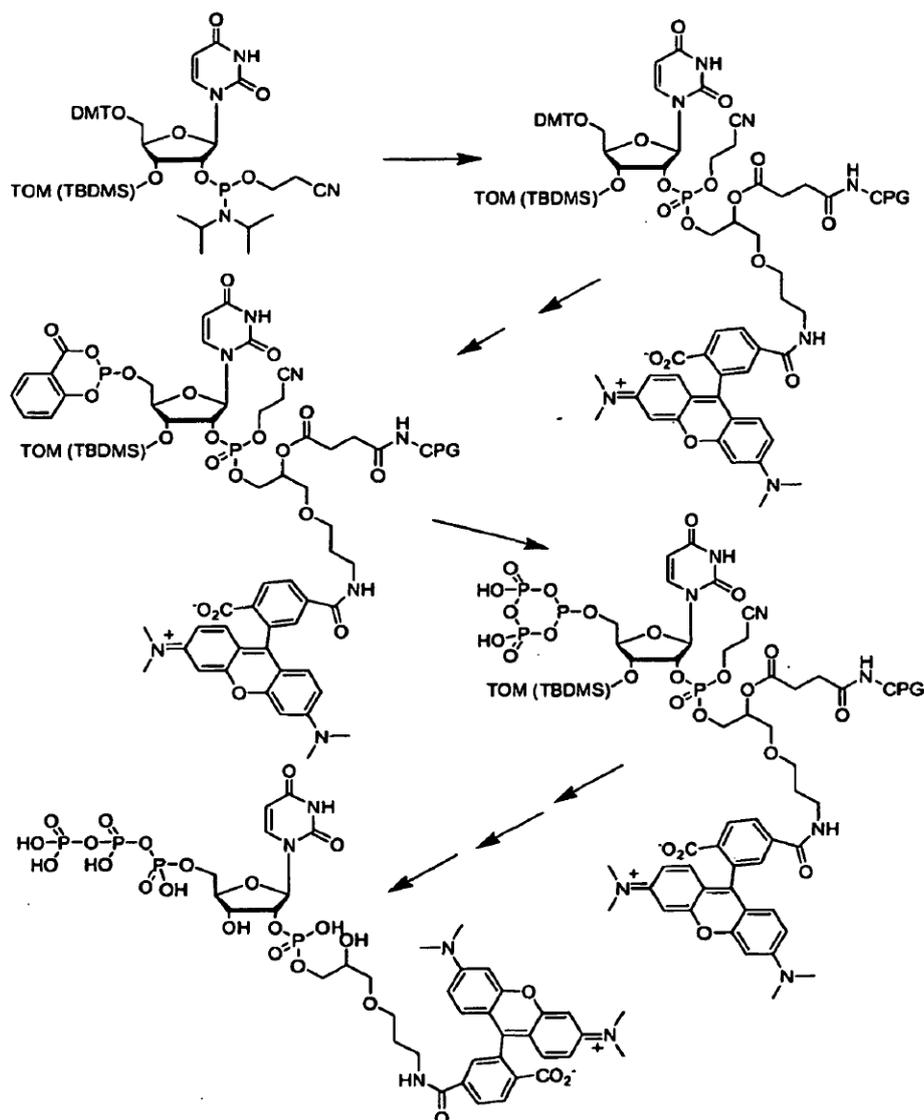
5

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente invención lo son a modo de ejemplo solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada. Se entiende que los expertos en la técnica pueden sugerir, a la vista de los ejemplos y realizaciones descritos en la presente invención, diversos cambios y modificaciones que quedan incluidos en el espíritu y ámbito de esta solicitud y en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

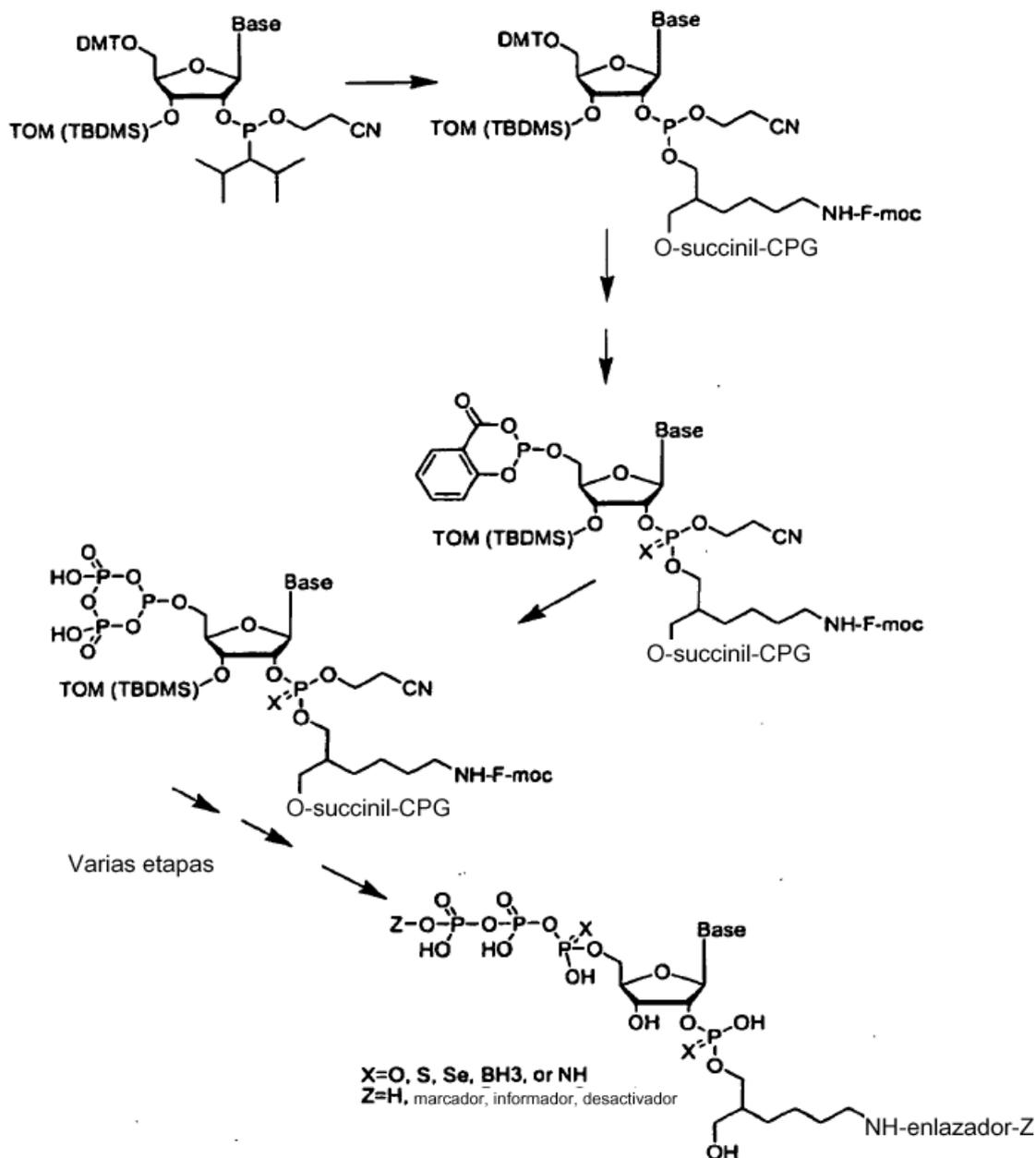
Ejemplo 1: Síntesis de un nucleótido tetrafosfato marcado

A continuación se muestra un ejemplo profético de un método para la síntesis de tetrafosfato uridina marcado con TAMRA en el fosfato-2'. Tal como se muestra, este método aprovecha las ventajas de las técnicas de síntesis en fase sólida y de materiales de inicio fácilmente disponibles, pero el esquema también es fácilmente adaptable con ligeras modificaciones a técnicas de síntesis en fase de solución. De igual modo, el esquema puede adaptarse fácilmente con ligeras modificaciones para la síntesis de otros nucleótidos marcados con colorantes. Por ejemplo, el TAMRA-cpg de la primera etapa puede sustituirse alternativamente por una fracción colorante adecuadamente protegida y modificada que contenga una función hidroxilo reactiva. Se acopla uridina-3'-tBDSilil CED fosforamidita (ANP-5684, Chemgenes, Wilmington, MA) a 3'-Tamra CPG (Glen Research, Sterling, VA). Tras la eliminación del grupo protector 5'-DHT, se hace reaccionar el grupo 5'-OH con salicil fosforocloridito y pirofosfato, seguido de oxidación (Ludwig y Eckstein, J. Org. Chem. 1989, 54, 631-635) y escisión del soporte dando lugar al compuesto deseado.



Ejemplo 2: Síntesis de un nucleótido tetrafosfato marcado

- 5 A continuación se muestra un ejemplo profético de un método más general para la síntesis de nucleósidos polifosfato marcados en fosfato-2' y nucleósidos polifosfato marcados en fosfato-2'-fosfato terminal. Tal como se muestra, este método aprovecha las ventajas de las técnicas de síntesis en fase sólida y de materiales de inicio fácilmente disponibles, pero el esquema también es fácilmente adaptable con ligeras modificaciones a técnicas de síntesis en fase de solución. Por ejemplo, el 3'-amino-modificador C7 CPG de la primera etapa
- 10 puede substituirse alternativamente por un amino-alquilo-enlazador con una función hidroxilo reactiva. Se acopla un nucleósido 3'-tBDSilil CED fosforamidita (por ejemplo, ANP-5684, Chemgenes, Wilmington, MA) a un 3'-amino-modificador C7 CPG (Glen Research, Sterling, VA). Tras la etapa de acoplamiento, puede modificarse el fósforo-2' a P=O, P=S, P=Se, ó P:BH₃, según sea necesario seleccionando los reactivos adecuados conocidos en la técnica. En las tres etapas siguientes, se elimina el grupo protector 5'-DMT, se hace reaccionar el grupo 5'-OH resultante con salicil fosforocloridita, y se desplaza el grupo salicililo por pirofosfato (Ludwig y Eckstein, J. Org. Chem. 1989, 54, 631-635). Alternativamente, puede utilizarse para otras modificaciones un polifosfato, por ejemplo tripolifosfato. De nuevo, el fósforo alfa puede modificarse a P=O, P=S, P=Se, ó P:BH₃, según sea necesario seleccionando los reactivos adecuados conocidos en la técnica. En la etapa siguiente, el polifosfato cíclico puede hidrolizarse o hacerse reaccionar con un colorante u otro marcador con un grupo nucleofílico para el marcaje del fosfato terminal. Finalmente, se escinde la molécula del soporte, se desprotege y se hace reaccionar con un derivado colorante reactivo tal como un éster NHS.
- 20



Ejemplo 3: Síntesis de un nucleótido tetrafosfato marcado

5

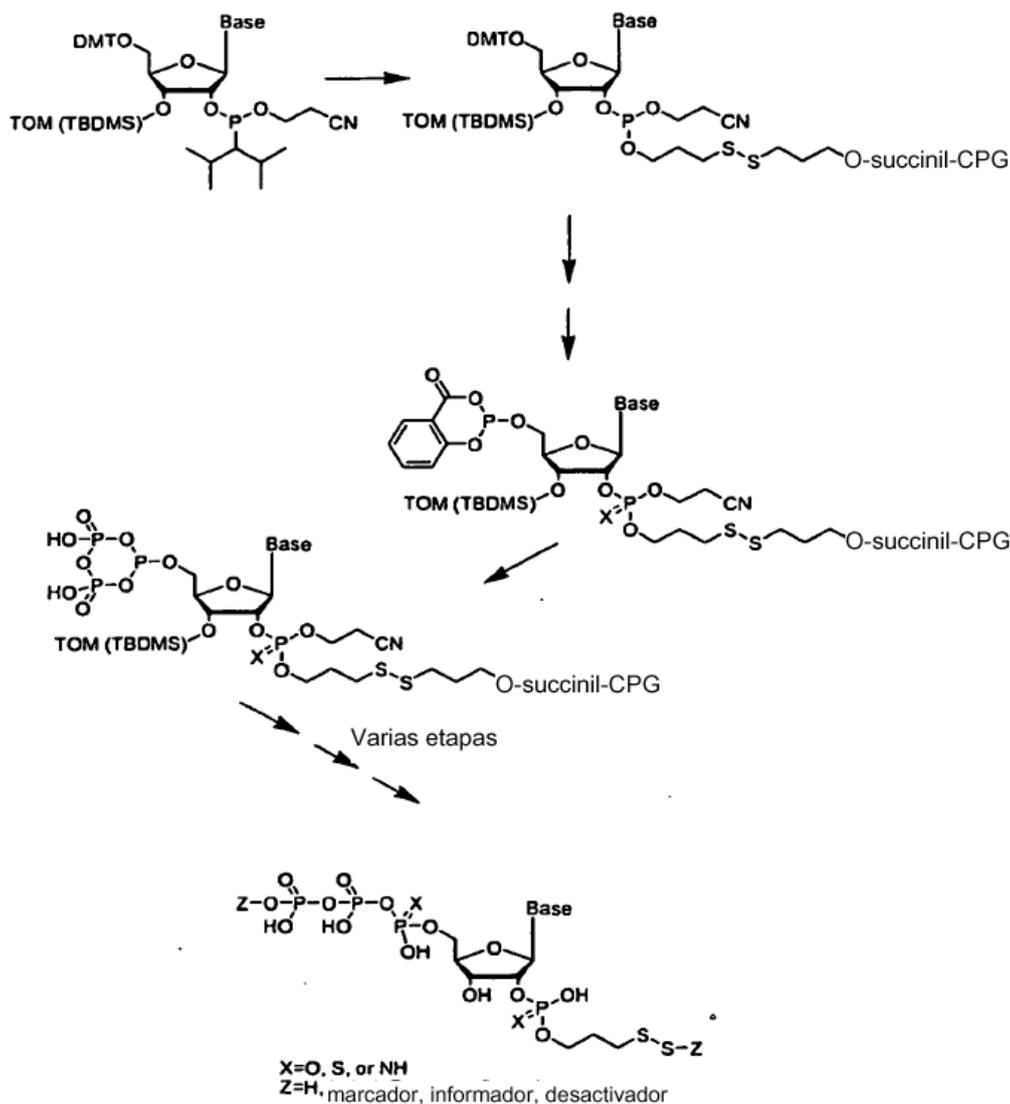
A continuación se muestra un ejemplo profético de un método más general para la síntesis de nucleósidos polifosfato marcados en fosfato-2' y nucleósidos polifosfato marcados en fosfato-2' y fosfato terminal escindibles. Tal como se muestra, este método aprovecha las ventajas de las técnicas de síntesis en fase sólida y de materiales directamente disponibles, pero el esquema también es fácilmente adaptable a ligeras modificaciones a técnicas de síntesis en fase de solución. Por ejemplo, el 3'-tiol-modificador C3 S-S CPG de la primera etapa del esquema puede substituirse alternativamente por un alquil-tiol-enlazador adecuadamente protegido con una función hidroxilo reactiva adecuadamente protegido. Se acopla un nucleósido 3'-tBDSilil CED fosforamidita (por ejemplo, ANP-5684, Chemgenes, Wilmington, MA) a el 3'-tiol-modificador C3 S-S CPG (Glen Research, Sterling, VA). Tras la etapa de acoplamiento, puede modificarse el fósforo-2' a P=O, P=S, P=Se, ó P: BH₃, según sea necesario seleccionando los reactivos adecuados conocidos en la técnica. En las tres etapas siguientes, se elimina el grupo protector 5'-DMT, se hace reaccionar el grupo 5'-OH resultante con salicil fosforocloridita, y se desplaza el grupo salicililo por pirofosfato (Ludwig y Eckstein, J. Org. Chem. 1989, 54, 631-635). Alternativamente, puede utilizarse para otras modificaciones un polifosfato, por ejemplo tripolifosfato. De nuevo, el fósforo alfa puede modificarse a P=O, P=S, P=Se, ó P: BH₃, según

10

15

sea necesario seleccionando los reactivos adecuados conocidos en la técnica. En la etapa siguiente, el polifosfato cíclico puede hidrolizarse o hacerse reaccionar con un colorante u otro marcador con un grupo nucleofílico para el marcaje del fosfato terminal. Finalmente, se escinde la molécula del soporte, se desprotege y se genera una función tiol reactiva mediante la reducción del enlace disulfuro. Ésta puede hacerse reaccionar con un derivado colorante reactivo con tiol tal como un derivado maleimida.

5

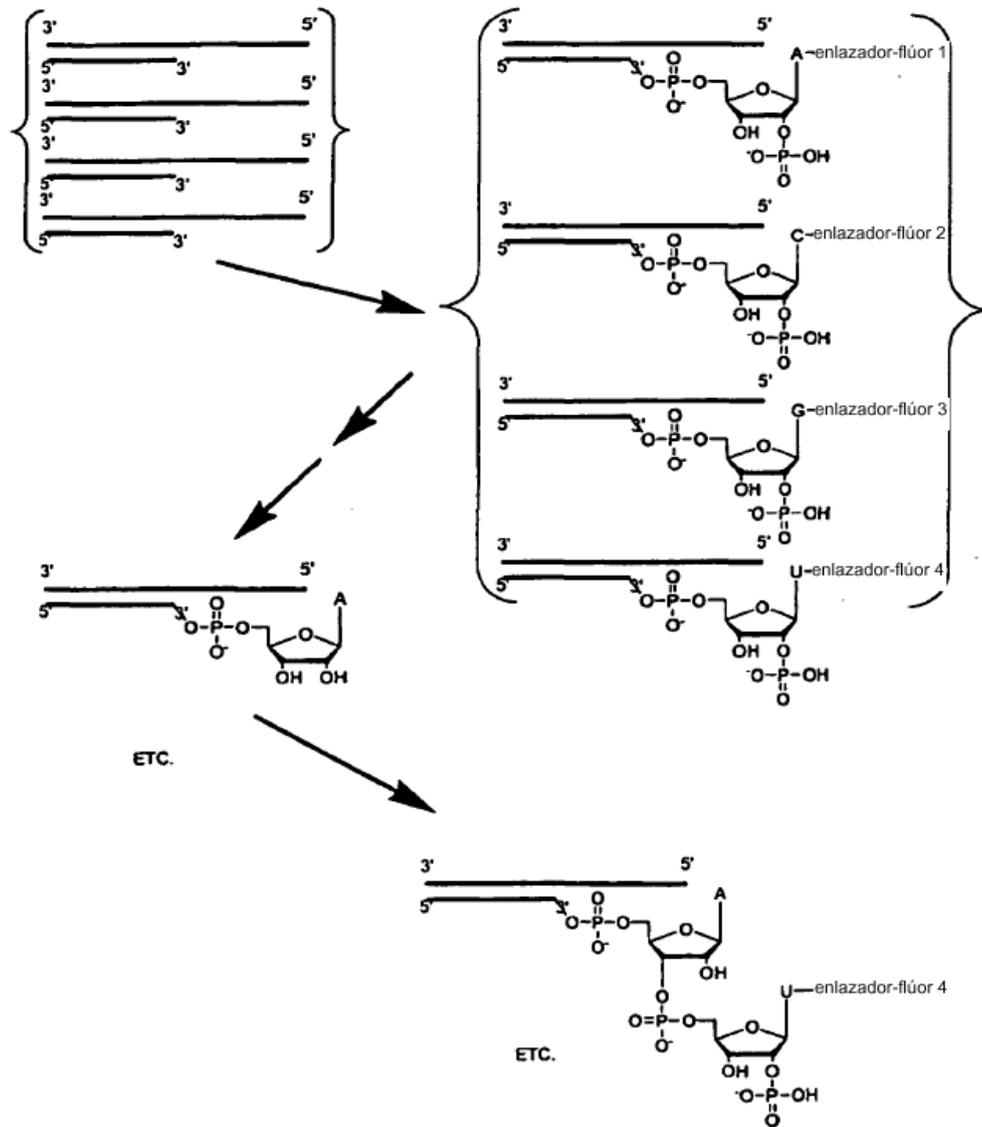


Ejemplo 4: Secuenciación simultánea con cuatro colores

10 Se describe un ejemplo profético de un método general para la secuenciación simultánea con 4 colores con las cuatro bases. En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer métodos para determinar una secuencia de ácido nucleico realizando ciclos sucesivos de extensión del cebador a lo largo de un molde de una sola cadena utilizando los cuatro nucleótidos simultáneamente. En algunas realizaciones, las reacciones de secuenciación se realizan sobre moldes unidos a perlas, que se inmovilizan en una célula de flujo o en un soporte sólido. Los ciclos comprenden etapas secuenciales de extensión, detección, eliminación del marcador y desbloqueo. En algunas realizaciones, los métodos utilizan nucleótidos terminadores en 2' marcados en la base a través de un enlazador escindible, utilizando para cada una de las cuatro bases un marcador singular y distinguible (por ejemplo un fluoróforo). En el esquema a título de ejemplo mostrado a continuación, la extensión se acompaña de una señal fluorescente generada por la incorporación, que es específica de la base incorporada. Se elimina el marcador mediante una escisión fotoquímica o química y los grupos bloqueantes se eliminan a continuación mediante tratamiento con fosfatasa. (**Linker : enlazador**)

15

20

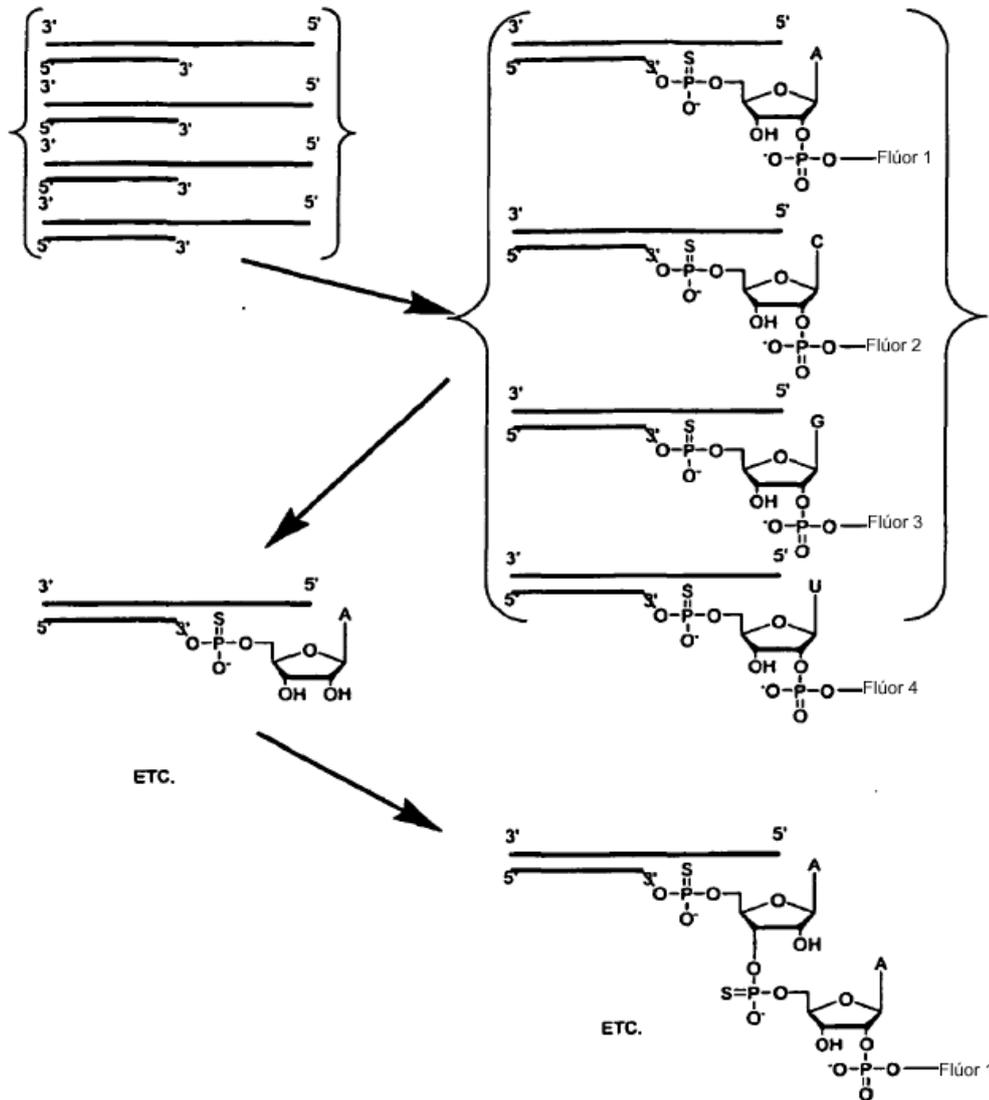


Ejemplo 5: Secuenciación simultánea con cuatro colores

5 Se describe un ejemplo profético de un método general para la secuenciación simultánea con 4 colores con las cuatro bases. En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer métodos para determinar una secuencia de ácido nucleico realizando ciclos sucesivos de extensión del cebador a lo largo de un molde de una sola cadena utilizando los cuatro nucleótidos simultáneamente. En algunas realizaciones, las reacciones de secuenciación se realizan sobre moldes unidos a perlas, que se inmovilizan en una célula de flujo o en un soporte sólido. Los ciclos comprenden etapas secuenciales de extensión, detección, eliminación del marcador y desbloqueo. En algunas realizaciones, los métodos utilizan nucleótidos terminadores en 2' marcados en el fosfato-2', utilizando para cada una de las cuatro bases un marcador singular y distinguible (por ejemplo, un fluoróforo). En el esquema a título de ejemplo mostrado a continuación, la extensión se acompaña de una señal fluorescente generada por la incorporación, que es específica de la base incorporada. A continuación se eliminan el marcador y los grupos bloqueantes por tratamiento con una fosfodiesterasa y una fosfatasa. Si es necesario, se modifica el esqueleto de fosfatos con enlaces fosforotioato.

10

15



Ejemplo 6: Secuenciación simultánea con cuatro colores

5 Se describe un ejemplo profético de un método general para la secuenciación simultánea con 4 colores con las cuatro bases. En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer métodos para determinar una secuencia de ácido nucleico realizando ciclos sucesivos de extensión del cebador a lo largo de un molde de una sola cadena utilizando los cuatro nucleótidos simultáneamente. En algunas realizaciones, las reacciones de secuenciación se realizan sobre moldes unidos a perlas, que se inmovilizan en una célula de flujo o en un soporte sólido. Los ciclos comprenden etapas secuenciales de extensión, detección, eliminación del marcador y desbloqueo. En algunas realizaciones, los métodos utilizan nucleótidos terminadores en 2' marcados en el fosfato-2' que está unido a la posición 2' a través de un sulfuro, utilizando para cada una de las cuatro bases un marcador singular y distinguible (por ejemplo, un fluoróforo). En el esquema a título de ejemplo mostrado a continuación, la extensión se acompaña de una señal fluorescente generada por la incorporación, que es específica de la base incorporada. A continuación se eliminan el marcador y los grupos bloqueantes mediante tratamiento con un ion metal tal como Ag^+ , Hg^{++} , yodo, etc.

10

15

grupo bloqueador 2'-monofosfato añadiendo 2 μ l de una solución 1 unidad/ μ l de CIAP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera, catálogo Promega (2005) # M182A) e incubación a 27°C durante 5 minutos. La CIAP se inactivó mediante incubación a 85°C durante 5 minutos. Se realizaron 3 ciclos adicionales de extensión y desbloqueo como el descrito más arriba. Se diluyeron los 2 μ l de reacción de extensión detenida en 18 μ l de GeneScan™-120LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, P/N 4322362): HiDi™ formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, P/N 311320) (1:40) y se incubó a 95°C durante 5 minutos.

Las reacciones de extensión se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando el Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer con el software Foundation Data Collection versión 2.0 y un análisis final con el software Applied Biosystems GeneScan™ versión 3.7. La figura 2 muestra los productos de extensión del cebador marcados con colorante FAM de cuatro ciclos de extensión y desbloqueo. En el ciclo 1 se muestra el cebador de inicio, antes de la adición de nucleótidos, así como los productos de extensión antes y después de la defosforilación con CIAP. En los ciclos 2 y 3 se muestran los productos de extensión antes y después de la defosforilación mientras que en el ciclo 4 el producto después de CIAP no se analizó por lo que solamente se muestra el producto antes de la defosforilación. La incorporación de un 2'-PO₄-NTP hace que el producto de extensión migre más rápidamente que el producto de partida, tomando como referencia los estándares de tamaño 120LIZ, debido a la carga negativa adicional del 2'-PO₄. Tras la incubación con CIAP se elimina el 2'-PO₄ y el producto de extensión migra más lentamente que el cebador de inicio tomando como referencia los estándares de tamaño, tal como era esperable. Ello se observa claramente en la figura 2 en la que el cebador de inicio migra aproximadamente 30 bases en relación con el estándar de tamaño, el producto de extensión migra a aproximadamente 26 bases, y el producto de extensión tras incubación con CIAP migra a aproximadamente 31 bases. Los productos de extensión de cada ciclo, antes y después de la incubación con CIAP migran como productos progresivamente más grandes tomando como referencia los estándares de tamaño 120LIZ como era de esperar en productos de extensión del cebador de tamaño creciente.

Ejemplo 8: Secuenciación mediante extensión ciclada del cebador con nucleótidos terminadores de 2' marcados con colorante

Este ejemplo muestra la aplicación de 2'-PO₄-NTPs marcados con colorante en reacciones de extensión y secuenciación con ciclado térmico del cebador dirigidas por molde. Los 2'-PO₄-NTPs marcados con colorante se utilizaron solamente en la última etapa de extensión para demostrar la incorporación específica de secuencia del 2'-PO₄-NTP correcto. Por ejemplo, en una reacción de extensión de tres ciclos se utilizan 2'-PO₄-NTPs no marcados en los dos primeros ciclos de extensión y 2'-PO₄-NTPs marcados con colorante en el tercer ciclo de extensión. Estas reacciones se realizan con la polimerasa ADN CS6 GQDSE, aunque pueden realizarse con otras polimerasas ADN modificadas para incorporar fácilmente NTP modificados en 2'. Las reacciones de extensión del cebador se realizaron en un tampón formado por Tricina (pH 7,75) 80 mM, KOAc 100 mM y Mn(OAc)₂ 1,0 mM. Cada reacción (50 μ l) contenía polimerasa ADN CS6 GQDSE 0.1 μ M, 2 unidades/ μ l de pirofosfatasa termoestable *rTth* (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg NJ), 0,02 μ M de oligorribonucleótido cebador marcado con 5'-FAM, 0,04 μ M de oligodeoxinucleótido molde y 0,5 μ M de aptámero optimizado para la ADN polimerasa. Más específicamente, las secuencias de cebador y molde fueron las siguientes:

Cebador: 5'-FAM-AGCAACAAGUUUAGUUCGUUCGAGCCGUGCGA-3'

Molde: 3'-ECGTTGTTCAAATCAAGCAAGCTCGGCACGCTACGTACGTACGT-5',

siendo E = dA invertida.

Las reacciones se ciclaron térmicamente en un Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700. Se retiró una alícuota de 2 μ l a 27°C y se añadió a 18 μ l de EDTA 1 mM. Se inició la reacción de extensión a 27°C con la adición de 2 μ l de una mezcla 250 μ M de cada 2'-PO₄-NTP o en la última etapa de extensión 2 μ l de una mezcla 25 μ M de cada 2'-PO₄-NTP marcado con colorante y a continuación se incubó a 64°C durante 5 minutos. Se redujo la temperatura a 15 °C, se retiró una alícuota de 2 μ l de la reacción de extensión y se añadió a 18 μ l de EDTA 1 mM. Se eliminó el grupo bloqueador 2'- PO₄ añadiendo 2 μ l de una solución de 1 unidad/ μ l de CIAP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera, catálogo Promega # M182A (éste es el # del catálogo antiguo, el nuevo número es M1821)) e incubación a 27°C durante 5 minutos. La CIAP se inactivó mediante incubación a 85°C durante 5 minutos. Los ciclos adicionales de extensión y desbloqueo se realizaron tal como se ha descrito más arriba. La reacción detenida con EDTA se filtró a través de Sephadex® G-50 (Sigma-Aldrich número G5080) para eliminar los 2'-PO₄-NTPs marcados con colorante no incorporados. Se diluyeron 2 μ l de la reacción de extensión filtrada en 18 μ l de GeneScan™-120LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems, P/N 4322362): HiDi™ formamida (Applied Biosystems, P/N 311320) (1:40) y se incubó a 95°C durante 3 minutos.

Las reacciones de extensión se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando el Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer con el software Foundation Data Collection versión 2.0 y un análisis final con el

software Applied Biosystems GeneScan™ versión 3.7. La figura 3 muestra el cebador de inicio marcado con colorante y el producto de extensión marcado con colorante de 1, 2 y 3 ciclos de SBS. El instrumento recoge los datos de emisión del colorante en cinco canales o recipientes representados como picos en los registros de la figura 3. La emisión espectral de un colorante concreto puede caer en uno o más recipientes y, por lo tanto, puede representarse como uno o más picos en la figura. En el ejemplo, R110 y FAM caen en el mismo recipiente y, por lo tanto, solamente se observa un pico. Todos los productos de extensión presentan un 2'-PO₄-NTP marcado con FAM en 5' y marcado con colorante en 3'. Para la extensión de una base única, la base molde es una A y se incorpora 2'-PO₄-UMP marcado con TAMRA. Tomando como referencia el estándar de tamaño GeneScan™-120LIZ™ (Applied Biosystems, Foster City CA), el producto de extensión de una base única migra a aproximadamente 31 bases comparado con el cebador de inicio marcado con FAM que migra entre 30 y 31 bases tomando como referencia el estándar de tamaño. Para la reacción de extensión del 2º ciclo, la base molde es una C y se incorpora 2'-PO₄-GMP marcado con R110. El producto de extensión de dos bases migra a aproximadamente 33 bases tomando como referencia el estándar de tamaño. Para la reacción de extensión del tercer ciclo, la base molde es una G y se incorpora 2'-PO₄-CMP marcado con ROX. El producto de extensión del cebador de tres bases migra entre 33 y 34 bases tomando como referencia el marcador de tamaño. Se demuestra la incorporación específica de secuencia de 2'-PO₄-NTPs marcados con colorante gracias a la longitud progresivamente mayor de los productos, tomando como referencia el estándar de tamaño, de cada ciclo conjuntamente con los espectros identificables de cada 2'-PO₄-NTP marcado con colorante incorporado.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente invención se describen solamente a modo de ejemplo y que a la vista de los mismos los expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios.

REIVINDICACIONES

1. Método para la secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde, que comprende:

- 5 (a) Incubar al menos un ácido nucleico molde con al menos una polimerasa, al menos un nucleótido terminador reversible modificado en 2' que comprende un grupo bloqueador en la posición 2' de la fracción azúcar, en el que el grupo bloqueador en la posición 2' es un fosfato, y al menos un ácido nucleico cebador complementario a al menos una subsecuencia del ácido nucleico molde, de manera que la polimerasa extiende el ácido nucleico cebador produciendo al menos un producto de extensión del cebador que incorpora el nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el extremo 3' del producto de extensión del cebador;
- 10 (b) Eliminar el grupo bloqueador de la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el extremo 3' del producto de extensión del cebador, y,
- 15 (c) Identificar el nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto de extensión del cebador antes y/o durante (b), de manera que al menos una parte de la secuencia de bases del ácido nucleico molde es determinable a partir del nucleótido terminador reversible modificado en 2' identificado, secuenciándose de este modo al menos una parte del ácido nucleico molde.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que (b) comprende incubar el producto de extensión del cebador con una actividad que elimina el fosfato de la posición 2'.

20 3. Método, según la reivindicación 2, en el que la actividad que elimina el fosfato en posición 2' es una fosfatasa.

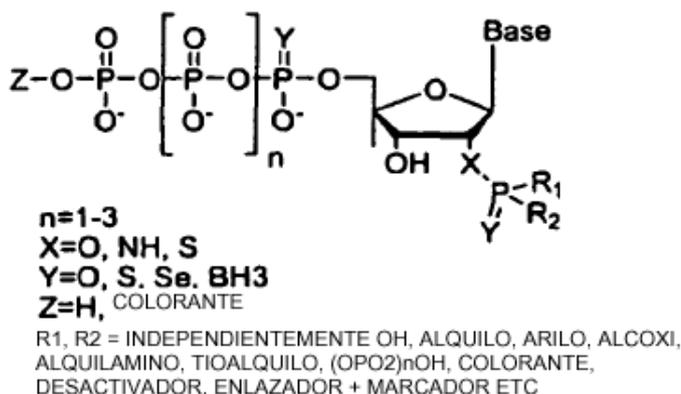
4. Método, según la reivindicación 2, en el que la actividad que elimina el fosfato en posición 2' es una endonucleasa II.

25 5. Método, según la reivindicación 2, en el que la actividad que elimina el fosfato en posición 2' es una endonucleasa IV.

6. Método, según la reivindicación 2, en el que la actividad que elimina el fosfato en posición 2' es un polinucleótido quinasa.

7. Método, según la reivindicación 2, en el que la actividad que elimina el fosfato en posición 2' es una fosfodiesterasa o una combinación de una fosfodiesterasa y una fosfatasa.

30 8. Método, según la reivindicación 1, en el que el nucleótido terminador reversible modificado en 2' se selecciona de grupo formado por:



9. Método, según la reivindicación 1, en el que el nucleótido terminador reversible modificado en 2' está marcado con al menos una fracción marcadora.

35 10. Método, según la reivindicación 9, en el que la fracción marcadora comprende un colorante fluorescente, una molécula luminiscente o un radioisótopo.

11. Método, según la reivindicación 10, en el que la fracción marcadora es un colorante fluorescente.

40 12. Método, según la reivindicación 9, en el que la fracción marcadora está unida a la base del nucleótido terminador reversible modificado en 2' a través de un enlazador escindible, y el método comprende además una etapa de escisión del enlazador.

13. Método, según la reivindicación 9, en el que la fracción marcadora está unida a un residuo azúcar del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
14. Método, según la reivindicación 9, en el que la fracción marcadora está unida a un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
- 5 15. Método, según la reivindicación 9, en el que el nucleótido terminador reversible modificado en 2' está unido a dos fracciones marcadoras que comprenden un dador y un aceptor.
16. Método, según la reivindicación 15, en el que el dador y el aceptor son un par informador y desactivador.
17. Método, según la reivindicación 15, en el que las dos fracciones marcadoras son capaces de experimentar transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
- 10 18. Método, según la reivindicación 16, en el que la fracción desactivadora está unida a la base del nucleótido terminador reversible modificado en 2' y la fracción informadora está unida a un fosfato, siempre y cuando el fosfato no sea el fosfato alfa del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
19. Método, según la reivindicación 18, en el que el fosfato es un fosfato gamma.
- 15 20. Método, según la reivindicación 18, en el que el fosfato es un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
21. Método, según la reivindicación 15, en el que una fracción marcadora está unida a un fosfato presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2' y la segunda fracción marcadora está unida a un segundo fosfato.
22. Método, según la reivindicación 21, en el que el segundo fosfato es un fosfato gamma.
- 20 23. Método, según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción comprende cuatro nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferentes, poseyendo cada uno de ellos una base y un marcado diferentes con una fracción marcadora diferente.
24. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de detección comprende detectar el pirofosfato generado con la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
- 25 25. Método, según la reivindicación 1, en el que el nucleótido terminador reversible modificado en 2' comprende un 2'-monofosfat-3'-hidroxil nucleótido.
26. Método, según la reivindicación 1, que comprende repetir las etapas (a)-(c) una o más veces.
27. Kit para la secuenciación mediante síntesis, que comprende:
- 30 - al menos un nucleótido terminador reversible modificado en 2' que comprende un fosfato como grupo bloqueador en la posición 2' de la fracción azúcar,
 - una polimerasa, y
 - un reactivo para eliminar la modificación en la posición 2' del nucleótido terminador reversible modificado en 2'.
- 35 28. Kit, según la reivindicación 27, en el que el reactivo se selecciona del grupo formado por una fosfatasa, una exonucleasa III, una endonucleasa IV y un polinucleótido quinasa.
29. Kit, según la reivindicación 27, en el que el nucleótido terminador reversible modificado en 2' está unido a un marcador.
30. Kit, según la reivindicación 27, que comprende además un nucleótido extensible.
31. Método de genotipado, que comprende:
- 40 a) Incubar un ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', comprendiendo dicho terminador reversible modificado una de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas y comprendiendo además una modificación en la posición 2' de la fracción azúcar, siendo dicha modificación en la
- 45 posición 2' un fosfato que termina la síntesis bajo condiciones en las que el cebador se hibrida al ácido nucleico molde y es extendido por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido;
- b) determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- c) si dicha señal no está presente, repetir las etapas a) y b) con un nucleótido terminador reversible

modificado en 2' diferente, comprendiendo dicho nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente una base diferente de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas,

- d) incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible,
- e) repetir las etapas a) a c) un número deseado de veces para determinar la secuencia de una parte de dicho ácido nucleico molde, y
- f) comparar la secuencia de la parte del ácido nucleico molde con secuencias conocidas de un sitio polimórfico.

32. Método para la secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde, que comprende:

- a) Incubar el ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', que comprende un fosfato como grupo bloqueador en la posición 2' de la fracción azúcar bajo condiciones en las que el cebador se hibrida al ácido nucleico molde y es extendido por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido.
- b) determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- c) incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible,
- d) repetir las etapas a) a d) un número deseado de veces para determinar la secuencia de al menos una parte de dicho ácido nucleico molde.

33. Método, según la reivindicación 32, en el que la etapa (a) se lleva a cabo utilizando una serie de nucleótidos terminadores reversibles modificados en 2' diferentes en una única mezcla, comprendiendo cada nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente una base diferente.

34. Método, según la reivindicación 32, en el que cada nucleótido terminador reversible modificado en 2' se añade secuencialmente hasta que se detecta una señal indicativa de la incorporación de un nucleótido terminador reversible modificado en 2'.

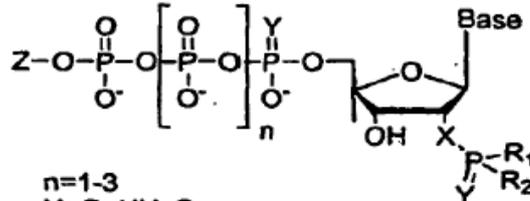
35. Método, según la reivindicación 32, en el que cada nucleótido terminador reversible modificado en 2' se añade simultáneamente y cada nucleótido terminador reversible modificado en 2' está marcado con una fracción de marcado diferente.

36. Método de secuenciación de al menos una parte de un ácido nucleico molde, que comprende:

- a) Incubar un ácido nucleico molde en una mezcla de reacción que comprende un cebador, una polimerasa, y un nucleótido terminador reversible modificado en 2', comprendiendo dicho terminador reversible modificado una de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas y comprendiendo además una modificación en la posición 2' de la fracción azúcar, siendo dicha modificación en la posición 2' un fosfato que termina la síntesis bajo condiciones en las que el cebador se hibrida al ácido nucleico molde y es extendido por la polimerasa presente en la reacción formando un producto extendido;
- b) determinar si está presente una señal indicativa de la incorporación del nucleótido terminador reversible modificado en 2' en el producto extendido;
- c) si dicha señal no está presente, repetir las etapas a) y b) con un nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente, comprendiendo dicho nucleótido terminador reversible modificado en 2' diferente una base diferente de las cuatro bases naturales o análogos de las mismas,
- d) incubar el producto extendido con una actividad que elimine la modificación presente en la posición 2' del nucleótido terminador reversible,
- e) repetir las etapas a) a d) un número deseado de veces para determinar la secuencia de al menos una parte de dicho ácido nucleico molde.

Figura 1

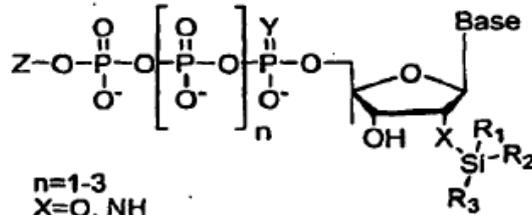
Fig. 1A



$n=1-3$
 $X=O, NH, S$
 $Y=O, S, Se, BH_3$
 $Z=H, COLORANTE$

$R_1, R_2 =$ INDEPENDIENTEMENTE OH, ALQUILO, ARILO, ALCOXI,
 ALQUILAMINO, TIOALQUILO, $(OPO_2)_nOH$, COLORANTE, DESACTIVADOR,
 ENLAZADOR + MARCADOR ETC

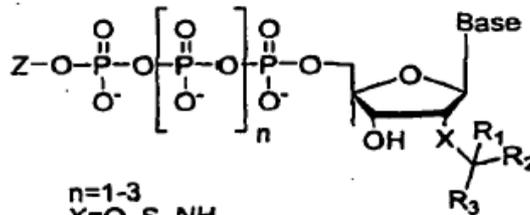
Fig. 1B



$n=1-3$
 $X=O, NH$
 $Y=O, S, Se, BH_3$
 $Z=H, COLORANTE$

$R_1, R_2, R_3 =$ INDEPENDIENTEMENTE ALQUILO, ARILO, ALCOXI,
 ALQUILAMINO, COLORANTE, DESACTIVADOR, ENLAZADOR +
 MARCADOR ETC

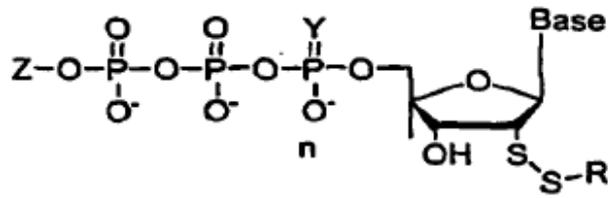
Fig. 1C



$n=1-3$
 $X=O, S, NH$
 $Z=H, COLORANTE$

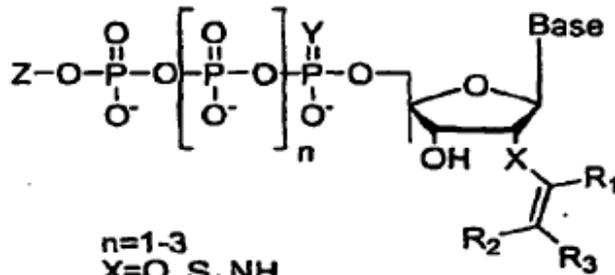
$R_1, R_2, R_3 =$ INDEPENDIENTEMENTE ALQUILO, ARILO, ALCOXI,
 ALQUILAMINO, COLORANTE, DESACTIVADOR, ENLAZADOR +
 MARCADOR ETC

Fig. 1D



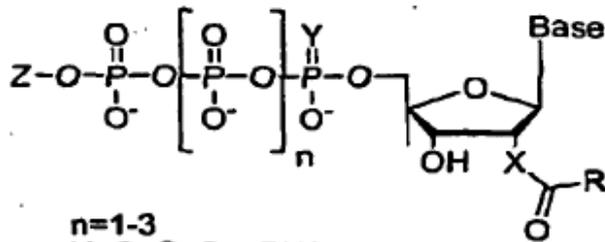
$n=1-3$
Y=O, S, Se, BH₃
Z=H, COLORANTE
R= ALQUILO, ARILO, COLORANTE, DESACTIVADOR, ENLAZADOR ETC

Fig. 1E



$n=1-3$
X=O, S, NH
Y=O, S, SE, BH₃
Z=H, COLORANTE
R₁, R₂, R₃ = INDEPENDIEMENTE ALQUILO, ARILO, ALCOXI, ALQUILAMINO, COLORANTE, DESACTIVADOR, ENLAZADOR + MARCADOR ETC

Fig. 1F



$n=1-3$
Y=O, S, Se, BH₃
Z=H, COLORANTE
R= ALQUILO, ARILO, COLORANTE, DESACTIVADOR, ENLAZADOR ETC

Fig. 1G

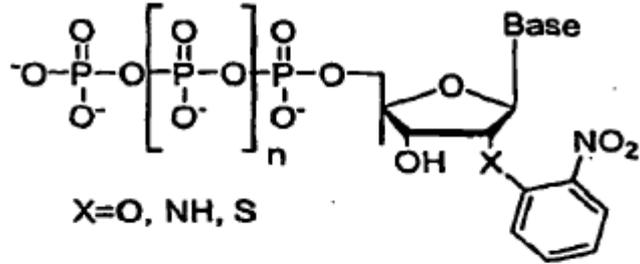
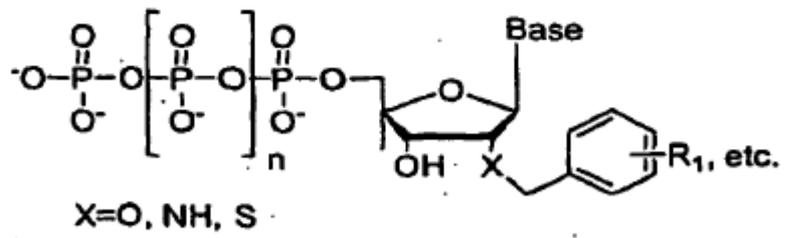


Fig. 1H



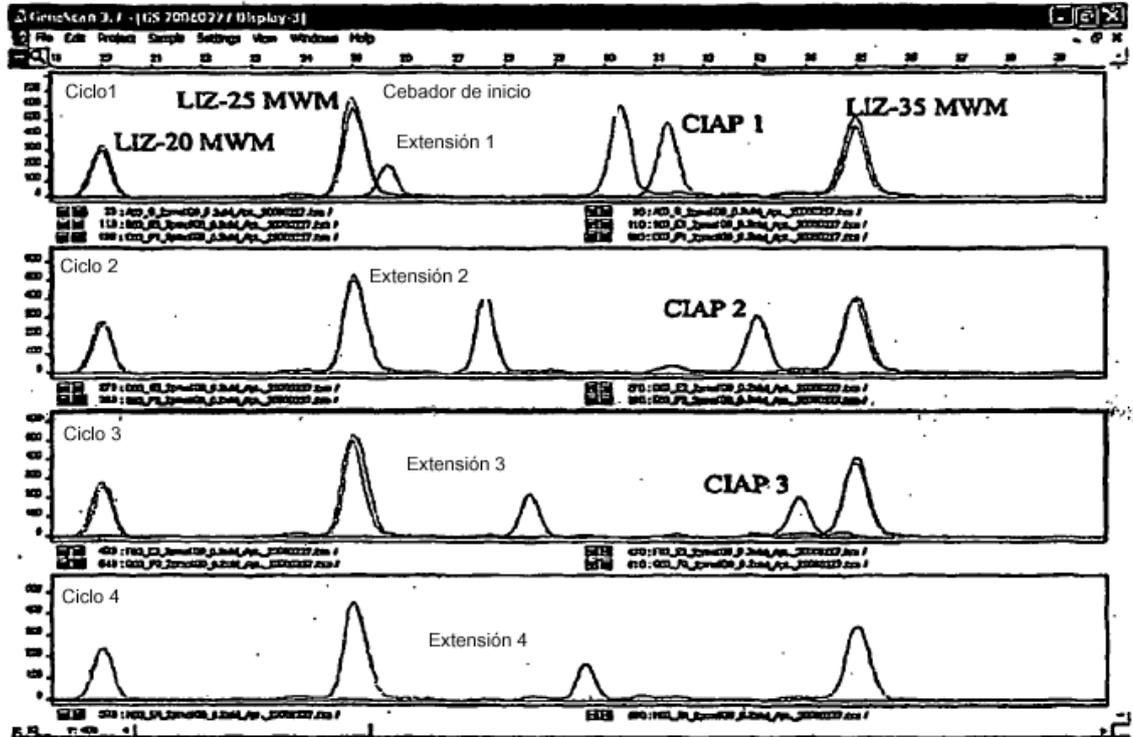


Figura 2

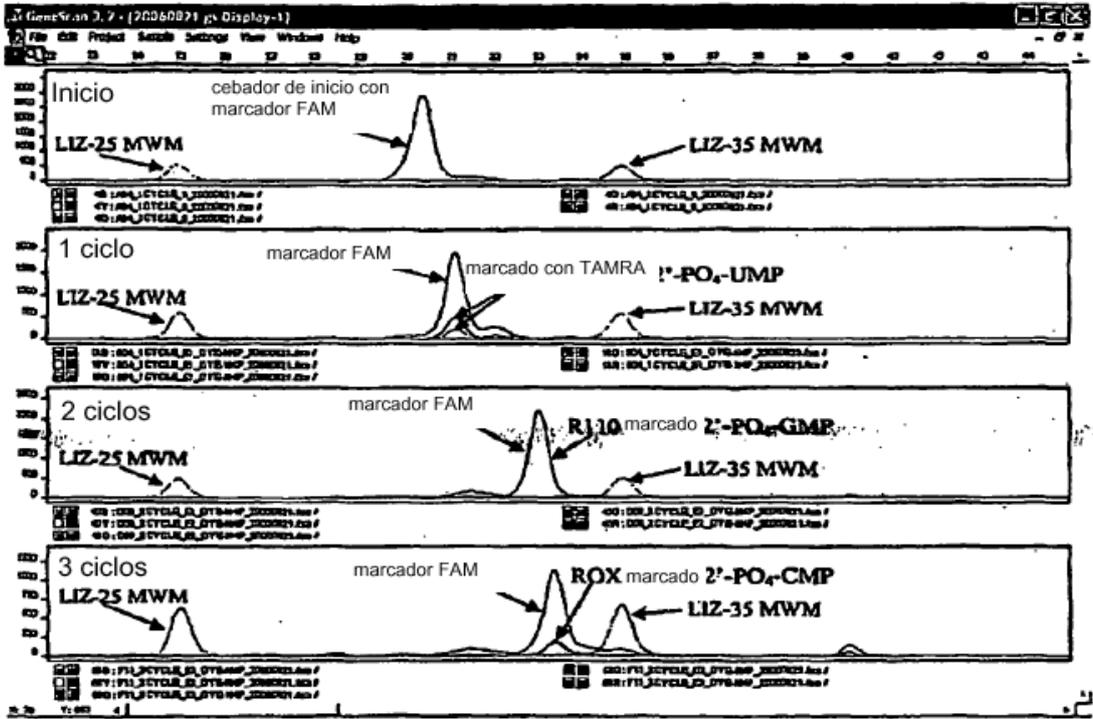


Figura 3