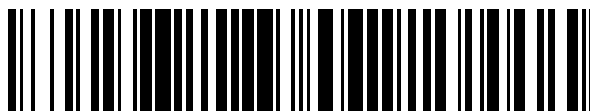


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 808**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2006 E 10011728 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2298930**

54 Título: **Preparación de plantillas para la secuenciación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

20.07.2005 GB 0514936

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)
Chesterford Research Park
Little Chesterford Nr Saffron Walden Essex CB10
1XL, GB**

72 Inventor/es:

**LIU, XIAOHAI;
MILTON, JOHN;
SMITH, GEOFFREY PAUL;
BARNES, COLIN;
RASOLONJATOVO, ISABELLE MARIE J.;
RIGATTI, ROBERTO;
WU, XIAOLIN;
OST, TOBIAS WILLIAM BARR;
WORSLEY, GRAHAM JOHN;
EARNSHAW, DAVID JAMES;
TURCATTI, GERARDO y
ROMIEU, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 398 808 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

Preparación de plantillas para la secuenciación de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a la preparación de moldes para reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos y a procedimientos de secuenciación de dichos moldes. En particular, la invención se refiere a la preparación de moléculas de molde de ácidos nucleicos listas para la secuenciación mediante la escisión de una o de ambas hebras de un ácido nucleico bicatenario inmovilizado sobre un soporte sólido.

Antecedentes de la invención

[0002] Los procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos se han conocido en la materia durante muchos años. Uno de los procedimientos mejor conocidos es el método "didesoxi" de Sanger, que se basa en el uso de trifosfatos de didesoxirribonucleósidos como terminadores de la cadena. El método de Sanger se ha adoptado para su uso en la secuenciación automática con el uso de terminadores de la cadena que incorporan marcadores fluorescentes.

[0003] En la materia también se conocen procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos que se basan en ciclos sucesivos de incorporación de análogos de ácidos nucleicos marcados con fluorescencia. En dichos procedimientos de "secuenciación mediante síntesis" o "secuenciación en ciclo" la identidad de la base añadida se determina después de la adición de cada nucleótido detectando el marcador fluorescente.

[0004] En particular, el documento US 5.302.509 describe un procedimiento para la secuenciación de un molde de polinucleótido que implica la realización de múltiples reacciones de extensión usando una polimerasa de ADN o una ligasa de ADN para incorporar sucesivamente polinucleótidos marcados complementarios de una hebra. En dicha reacción de "secuenciación mediante síntesis" se crea una nueva hebra de polinucleótidos apareada con la hebra de molde en la dirección 5' a 3' mediante la incorporación sucesiva de nucleótidos individuales complementarios de la hebra de molde. Los trifosfatos de nucleósidos usados en la reacción de secuenciación están marcados en la posición 3' con diferentes marcajes de 3', lo que permite la determinación de la identidad del nucleótido incorporado según se añaden nucleótidos sucesivos.

[0005] Con objeto de maximizar el rendimiento de las reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos, es ventajoso ser capaz de secuenciar múltiples moléculas de molde en paralelo. El procesamiento en paralelo de múltiples moldes puede conseguirse con el uso de la tecnología de matrices de ácidos nucleicos. Estas matrices consisten típicamente en una matriz de alta densidad de polinucleótidos inmovilizados sobre un material de soporte sólido.

[0006] En la materia se han descrito varios procedimientos para la fabricación de matrices de ácidos nucleicos inmovilizados. De particular interés, ambos documentos WO 98/44151 y WO 00/18957 describen procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos que permiten que los productos de la amplificación sean inmovilizados sobre un soporte sólido con objeto de formar matrices formadas por agregados o "colonias" formadas por una pluralidad de hebras idénticas de polinucleótidos inmovilizados y una pluralidad de hebras complementarias idénticas inmovilizadas. Las matrices de este tipo se denominan en este documento "matrices agregadas". Las moléculas de ácidos nucleicos presentes en las colonias de ADN de las matrices agregadas preparadas según estos procedimientos pueden proporcionar moldes para las reacciones de secuenciación, por ejemplo, según se describe en el documento WO 98/44152.

[0007] Los productos de las reacciones de amplificación en fase sólida, tales como los descritos en los documentos WO 98/44151 y WO 00/18957, son las denominadas estructuras "en puente", formadas por el apareamiento de pares de hebras de polinucleótidos inmovilizadas y hebras complementarias inmovilizadas, estando ambas hebras unidas al soporte sólido por el extremo 5'. Las matrices formadas por dichas estructuras en puente proporcionan moldes ineficaces para la secuenciación de ácidos nucleicos, dado que la hibridación de un cebador de secuenciación convencional a una de las hebras inmovilizadas no se ve favorecida en comparación con el apareamiento de esta hebra con su hebra complementaria inmovilizada en unas condiciones de hibridación estándar.

[0008] Con objeto de proporcionar moldes más adecuados para la secuenciación de ácidos nucleicos, se prefiere eliminar sustancialmente todas o al menos una porción de una de las hebras inmovilizadas en la estructura "en puente", con objeto de generar un molde de sea al menos parcialmente monocatenario. La porción del molde que sea monocatenaria estará así disponible para la hibridación con un cebador de secuenciación. El proceso de eliminar todas o una porción de una de las hebras inmovilizadas en una estructura de ácidos nucleicos bicatenarios "en puente" puede denominarse en este documento "linealización".

65

5 **[0009]** En la materia se sabe que las estructuras de molde en puente pueden linealizarse mediante la escisión de una o de ambas hebras con una endonucleasa de restricción. Un inconveniente del uso de las enzimas de restricción para la linealización es que requieren la presencia de una secuencia de reconocimiento específica para la enzima en una ubicación adecuada en la estructura de molde en puente. Existe el riesgo de que la misma secuencia de reconocimiento pueda aparecer en otro sitio de la estructura en puente, lo que significa que la enzima podría cortar en uno o más sitios adicionales, además del sitio de escisión pretendido para la linealización. Esto puede suponer un problema, en particular cuando las estructuras en puente que se van a linealizar son derivadas mediante la amplificación en fase sólida de moldes de una secuencia parcialmente desconocida, dado que no puede predecirse con antelación si una enzima en particular cortará dentro de la región de la secuencia desconocida.

10 **[0010]** Por lo tanto, en un aspecto general, la invención proporciona procedimientos para la linealización de moldes que no requieren la escisión con endonucleasas de restricción, o con endonucleasas de corte.

15 **[0011]** El documento WO/0053617 desvela un procedimiento para ensamblar secuencias largas de ADN a partir de oligonucleótidos sintéticos cortos. Los oligonucleótidos cortos se sintetizan *in situ* sobre un soporte sólido, y subsiguientemente se escinden del soporte sólido antes o durante el ensamblaje en secuencias completas de ADN. Una fracción escindible puede unirse al soporte sólido y a los oligonucleótidos. Esta fracción escindible puede contener un sitio abásico, que puede ser escindido entonces por la Endonucleasa IV.

20 **[0012]** En otro aspecto general, la invención se refiere a procedimientos para la linealización de moldes que sean compatibles con un tipo en particular de micromatriz con soporte sólido. Más específicamente, la invención proporciona procedimientos de linealización que son compatibles con matrices formadas sobre hidrogeles de poliacrilamida sobre soporte sólido.

25 **[0013]** En la preparación de matrices moleculares basadas en hidrogel sobre soporte sólido, se forma un hidrogel y las moléculas son desplegadas desde el mismo. Estas dos características - formación del hidrogel y construcción de la matriz - pueden efectuarse secuencialmente o simultáneamente. Cuando el hidrogel se forma antes de la formación de la matriz, se produce típicamente dejando polimerizar una mezcla de comonomeros. Generalmente, la mezcla de comonomeros contiene acrilamida y uno o más comonomeros, el último de los cuales permite, en parte, la
30 subsiguiente inmovilización de las moléculas de interés para que formen la matriz molecular.

[0014] Los comonomeros usados para crear el hidrogel contienen típicamente una funcionalidad que sirve para participar en la reticulación del hidrogel y/o para inmovilizar el hidrogel sobre el soporte sólido y facilitar la asociación con las moléculas objetivo de interés.

35 **[0015]** Los presentes inventores han demostrado que las matrices agregadas pueden formarse sobre dichos hidrogeles sobre soporte sólido mediante la amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida usando cebadores de amplificación directa e inversa unidos al hidrogel por sus extremos 5', conduciendo a la producción de matrices agregadas de productos de amplificación con una estructura "en puente". Con objeto de maximizar la eficacia de las
40 reacciones de secuenciación que usan moldes derivados de dichos productos en puente, hay una necesidad de procedimientos de linealización que sean compatibles con la superficie del hidrogel y con las subsiguientes reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

Resumen de la invención

45 **[0016]** La invención proporciona procedimientos según se define en las reivindicaciones.

[0017] La invención proporciona un procedimiento para generar un molde para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende,

- 50
- (i) proporcionar al menos una molécula de un ácido nucleico bicatenario, en la que ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario están unidas a un soporte sólido por el extremo 5',
 - (ii) escindir una de las hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario, en un sitio abásico, en el que el sitio para la escisión está posicionado en la secuencia no objetivo, y
 - 55 (iii) someter la hebra escindida a unas condiciones desnaturalizantes para eliminar la porción de la hebra escindida que no está unida al soporte sólido, generando así un molde parcialmente o sustancialmente monocatenario para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos.

60 **[0018]** En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico bicatenario puede ser escindida en un sitio de escisión predeterminado. Por sitio de escisión "predeterminado" se entiende un sitio cuya ubicación se determina previamente a la reacción de escisión, por oposición a la escisión en un sitio aleatorio, cuya ubicación no se conoce por anticipado.

65 **[0019]** En una forma de realización, la escisión puede producirse en un sitio de escisión de una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende uno o más, o cualquier combinación de, nucleótidos no

naturales, ribonucleótidos o una modificación química no nucleotídica. La posición de este sitio de escisión está preferiblemente predeterminada.

5 **[0020]** Puede tratarse una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario para generar un sitio abásico y a continuación escindir en el sitio abásico. En una forma de realización específica no limitante, en la que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una base de uracilo, el sitio abásico puede ser generado mediante el tratamiento con uracilglucosilasa de ADN y después escindirse con endonucleasa, un tratamiento térmico o un tratamiento alcalino. Se desvela un procedimiento en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario puede comprender uno o más ribonucleótidos, y la etapa (ii) puede comprender la escisión de esta hebra adyacente a un
10 ribonucleótido usando una ARNasa o un agente de escisión química no enzimático. Algunos agentes de escisión química no enzimáticos incluyen iones metálicos, y en particular iones metálicos de lantánidos, por ejemplo, La^{3+} o Lu^{3+} .

15 **[0021]** En una forma de realización adicional, una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario puede tener un péptido unido covalentemente en el extremo 5', y la etapa (ii) puede comprender la escisión del péptido.

[0022] En un tercer aspecto, la invención también proporciona procedimientos para la secuenciación de moldes de ácidos nucleicos generados según el procedimiento de la reivindicación 1.

20 **[0023]** La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los párrafos siguientes se definen con más detalle diferentes características de los diversos aspectos de la invención. Cada característica así definida en relación con un aspecto de la invención puede combinarse con características descritas en relación con otro aspecto de la invención, salvo que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas
25 o ventajosas.

Breve descripción de los dibujos

30 **[0024]**

La Fig. 1 es una ilustración esquemática de la formación de un agregado mediante PCR en fase sólida y la subsiguiente linealización y apareamiento de un cebador de secuenciación. El material de partida de la etapa (a) es un soporte sólido injertado con una mezcla de cebadores de amplificación, uno de los cuales comprende un sitio de escisión. Los cebadores están unidos covalentemente al soporte sólido por el extremo
35 5'. Sobre el soporte sólido también se aplica una molécula de sustrato que se va a amplificar, bien mediante hibridación de uno de los cebadores inmovilizados, o bien mediante la unión covalente sobre el soporte por el extremo 5'. La Fig. 1 (b) ilustra esquemáticamente los productos de amplificación "en puente" resultantes de la amplificación en fase sólida. Por simplicidad sólo se muestra un pequeño número de productos "en puente". Entonces los productos de la amplificación son "linealizados" mediante escisión en los sitios de escisión derivados de los cebadores de amplificación (Fig. 1 (c)). Los productos de la reacción de escisión pueden someterse entonces a unas condiciones desnaturizantes, dando como resultado la eliminación de las porciones de las hebras escindidas que ya no están unidas covalentemente al soporte sólido (Fig. 1 (d)). El resto de productos monocatenarios pueden hibridarse entonces con un cebador de secuenciación (Fig. 1 (e)).

45 La Fig. 2 es una ilustración esquemática de la linealización mediante la escisión en un sitio abásico generado por el tratamiento con un polinucleótido que contiene U con uracilglucosilasa de ADN. Los productos en puente de la amplificación se generan mediante la amplificación de la estructura del molde ilustrada esquemáticamente en la Fig. 2 (a) con cebadores inmovilizados en un soporte sólido. Uno de los cebadores de amplificación contiene un nucleótido de desoxiuridina representado como U. Por simplicidad, en la Fig. 2 (b) se ilustra un único producto en puente. Se genera un sitio abásico en una hebra mediante el tratamiento con uracilglucosilasa de ADN. Entonces esta hebra puede escindirse mediante la hidrólisis del sitio abásico para generar la estructura "cortada" ilustrada en la Fig. 2 (c). La hidrólisis del sitio abásico genera un grupo hidroxilo libre en 3' que puede servir como punto de inicio para una reacción de secuenciación. La
50 secuenciación puede llevarse a cabo usando una polimerasa de desplazamiento de hebra (según se muestra en la Fig. 2 (d)), o puede eliminarse la porción de la hebra escindida no unida al soporte sólido mediante una desnaturización previa a la secuenciación. En este último caso, la reacción de secuenciación podría iniciarse mediante la hibridación de un cebador de secuenciación como una alternativa al cebado a partir de la propia hebra escindida.

60 La Fig. 3 ilustra la linealización mediante la escisión con una enzima de restricción. La Fig. 3 (a) muestra la secuencia de una molécula de ácido nucleico bicatenario representativa que incluye secuencias derivadas de los cebadores de amplificación P5 y P7 utilizados en los ejemplos anexos, un sitio de restricción para la escisión por parte de la enzima BgIII y un sitio para la unión de un cebador de secuenciación. "Genómica" representa una secuencia derivada de un fragmento de ADN genómico. El fragmento genómico tendrá
65

típicamente 400 - 700 pb de longitud, aunque la invención no se limita a secuencias de esta longitud, y puede ser una secuencia conocida, parcialmente conocida o desconocida. La Fig. 3 (b) ilustra esquemáticamente la linealización de un único producto de ácido nucleico bicatenario en puente con la secuencia mostrada en la Fig. 3 (a). Las dos hebras complementarias que forman el producto en puente están unidas covalentemente a un soporte sólido por sus extremos 5'. El producto en puente es escindido en primer lugar con BgIII y después desnaturizado para eliminar sustancialmente toda una hebra. La única hebra restante sobre el soporte sólido puede hibridarse entonces con un cebador de secuenciación.

La Fig. 4 ilustra gráficamente la escisión de un conector de diol mediante tratamiento con peryodato sódico.

La Fig. 5 muestra la intensidad de la señal frente al tiempo para colonias teñidas con verde SyBr tratadas con peryodato, ilustrando la escisión selectiva de las colonias que contienen conectores de diol.

La Fig. 6 ilustra gráficamente la escisión de colonias que contienen conectores de diol.

La Fig. 7 es una representación esquemática de una celda de flujo de 8 canales adecuada para llevar a cabo los procedimientos de la invención.

La Fig. 8 ilustra la estructura y la secuencia de un ejemplo de molde de ADN usado para una amplificación mediante PCR en fase sólida de los ejemplos anexos. Las secuencias de los cebadores de amplificación P5 y P7 se muestran en negrita.

La Fig. 9 muestra imágenes fluorescentes de CCD de matrices agrupadas de colonias de ácidos nucleicos tras un único ciclo de incorporación de nucleótidos en unas condiciones de secuenciación estándar. El cuadro (A) ilustra la incorporación de nucleótidos en las colonias de ácidos nucleicos que no habían sido linealizadas. El cuadro (B) ilustra la incorporación de nucleótidos en las colonias de ácidos nucleicos que habían sido linealizadas mediante la escisión con peryodato de un conector de diol.

La Fig. 10 muestra los gráficos de los histogramas (intensidad de la fluorescencia frente al número de colonias) correspondientes a las imágenes de fluorescencia de CCD mostradas en la Figura 9.

Descripción detallada de la invención

[0025] En sus diversos aspectos, la invención se refiere de forma general a procedimientos para formar moldes para la secuenciación de ácidos nucleicos que parten de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios inmovilizadas sobre un soporte sólido, y a procedimientos para la secuenciación de dichos moldes.

[0026] Las moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que proporcionan el punto de partida para la formación de los moldes para la secuenciación según el primer y segundo aspecto de la invención se caracterizan porque están formadas a partir de hebras de ácidos nucleicos hibridadas de forma complementaria que están unidas al soporte sólido por sus extremos 5', preferiblemente a través de una unión covalente. Cuando las hebras complementarias de la molécula de ácido nucleico bicatenario hibridan, tal y como será generalmente el caso cuando las moléculas se mantienen en condiciones no desnaturizantes, dichas moléculas pueden denominarse en este documento como estructuras "en puente".

[0027] Los procedimientos de formación de moldes proporcionados por la invención implican la escisión de una hebra de la molécula bicatenaria. Después de la etapa de escisión, los productos escindidos pueden someterse a unas condiciones desnaturizantes para eliminar la(s) porción(es) de la hebra escindida que no está(n) unida(s) al soporte sólido, es decir, la(s) porción(es) ubicada(s) secuencia abajo del sitio de escisión cuando una hebra dada se visualiza de 5' a 3'.

[0028] La molécula de molde resultante será al menos parcialmente monocatenaria y puede ser sustancialmente monocatenaria. La longitud de la porción monocatenaria dependerá de la posición del sitio de escisión con respecto a los extremos 5' de las hebras monocatenarias. Se apreciará que la ubicación del sitio de escisión determina cuántas hebras permanecen unidas el soporte sólido después de la escisión y la desnaturización.

[0029] La molécula de ácido nucleico bicatenario de la que va a derivar el molde de secuenciación comprende dos hebras de polinucleótidos hibridadas (complementarias) que están, ambas, unidas a un soporte sólido por el, o cerca del, extremo 5'. La unión al soporte sólido será preferentemente a través de una unión covalente. Se apreciará que las hebras hibridadas no tienen que ser necesariamente completamente complementarias a lo largo de su longitud total.

[0030] Cuando se hace referencia a la unión de moléculas (por ejemplo, de ácidos nucleicos) a un soporte sólido, los términos "inmovilizada" y "unida" se usan de forma intercambiable en este documento, y ambos términos pretenden englobar la unión directa o indirecta, covalente o no covalente, salvo que se indique de otro modo,

explícitamente o por el contexto. En ciertas formas de realización de la invención puede ser preferida la unión covalente, pero generalmente todo lo que se requiere es que las moléculas (por ejemplo, los ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas al soporte en las condiciones en las que se pretende usar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieren la amplificación y/o la secuenciación de ácidos nucleicos.

5

[0031] Algunas formas de realización de la invención hacen uso de soportes sólidos formados por un sustrato inerte o matriz (por ejemplo, portaobjetos de vidrio, perlas de polímero, etc.) que ha sido "funcionalizado", por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o un recubrimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente de biomoléculas, tales como polinucleótidos. Algunos ejemplos de dichos soportes incluyen, pero no se limitan a, hidrogeles de poli(acrilamida) soportados sobre un sustrato inerte tal como vidrio. En dichas formas de realización, las biomoléculas (por ejemplo, polinucleótidos) pueden unirse directamente covalentemente al material intermedio (por ejemplo, el hidrogel) pero el propio material intermedio puede no estar unido covalentemente al sustrato o matriz (por ejemplo, el sustrato de vidrio). El término "unión covalente a un soporte sólido" debe interpretarse consecuentemente como que engloba este tipo de disposición.

10

[0032] En todos los aspectos de la invención, la unión covalente puede conseguirse a través de un nucleófilo que contiene azufre, tal como fosforotioato, presente en el extremo 5' de una hebra de polinucleótido. En el caso de matrices basadas en hidrogeles de poli(acrilamida) sobre soporte sólido, este nucleófilo se unirá a un grupo "C" presente en el hidrogel.

15

[0033] El ácido nucleico "bicatenario" que se va a escindir puede de hecho ser parcialmente monocatenario en el (los) extremo(s) 5' de una o de ambas hebras. Como se discutirá con más detalle en este documento a continuación, el ácido nucleico bicatenario estará formado típicamente por dos hebras de polinucleótidos complementarios formadas por desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, pero adicionalmente pueden incluir uno o más ribonucleótidos y/o fracciones químicas no nucleotídicas y/o nucleótidos no naturales y/o uniones del esqueleto no naturales. En particular, el ácido nucleico bicatenario puede incluir fracciones químicas no nucleotídicas, por ejemplo, conectores o separadores, en el extremo 5' de una o de ambas hebras. A modo de ejemplo no limitante, el ácido nucleico bicatenario puede incluir nucleótidos metilados, bases de uracilo, grupos fosforotioato, también conjugados peptídicos, etc. Dichas modificaciones que no son de ADN o no son naturales pueden incluirse con objeto de permitir la escisión, o para conferir alguna otra propiedad deseable, por ejemplo, para permitir la unión covalente a un soporte sólido, o para que actúen como separadores para ubicar el sitio de escisión a una distancia óptima del soporte sólido.

20

[0034] El sitio de escisión de una hebra de ácido nucleico bicatenario puede posicionarse, dependiendo de la naturaleza de la reacción de escisión, en una región de la molécula que es monocatenaria cuando las hebras complementarias están hibridadas. Según se describió anteriormente, el ácido nucleico bicatenario puede de hecho ser parcialmente monocatenario en uno o en ambos extremos 5', por ejemplo, próximos al sitio de unión con el soporte sólido. En el ámbito de la invención está que un sitio de escisión este posicionado dentro de dicha región monocatenaria. En otras formas de realización, el sitio de escisión puede estar presente en una fracción química no nucleotídica unida covalentemente al extremo 5' de una hebra del ácido nucleico bicatenario, por ejemplo, una fracción conectora.

25

[0035] El ácido nucleico bicatenario comprenderá una región "objetivo" que se desea secuenciar total o parcialmente. La naturaleza de la región objetivo no es limitante de la invención. Puede tener una secuencia previamente conocida o desconocida, y puede derivar, por ejemplo, de un fragmento de ADN genómico, de un ADNc, etc. La molécula de ácido nucleico bicatenario también incluye secuencias no objetivo, por ejemplo, en los extremos 5' y 3' de ambas hebras, la región flanqueante del objetivo. Si el ácido nucleico bicatenario está formado mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida, estas secuencias no objetivo pueden derivar de los cebadores usados para la reacción de amplificación. Los sitios de escisión de una hebra del ácido nucleico bicatenario están ubicados en las secuencias no objetivo.

30

[0036] El ácido nucleico bicatenario puede formar parte de un agregado o de una colonia formada por muchas moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios, y el propio agregado o colonia puede formar parte de una matriz de dichos agregados o colonias, denominándose en este documento como "matriz agregada". En dicha matriz, cada molécula de ácido nucleico bicatenario dentro de cada colonia comprenderá la misma región objetivo, mientras que diferentes colonias pueden estar formadas por moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que comprenden diferentes regiones objetivo. En una forma de realización preferida, al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, de las colonias de una matriz agregada dada, estarán formadas por moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que comprenden diferentes regiones objetivo, aunque dentro de cada colonia individual de la matriz todas las moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios comprenderán la misma región objetivo.

35

[0037] Se prefiere que, en dicha matriz agregada, todas las moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios de todas las colonias de la matriz comprendan el mismo tipo de sitio de escisión. Esto se prefiere incluso cuando sobre la matriz se forman diferentes colonias de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que comprenden diferentes

regiones objetivo, dado que permite que todas las moléculas bicatenarias de la matriz sean escindidas simultáneamente en unas condiciones de reacción de escisión idénticas.

Procedimientos de escisión

5

[0038] Pueden usarse varios procedimientos de escisión según el primer y el segundo aspecto de la invención para escindir una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Como referencia también se analizan otros procedimientos de escisión con más detalle a continuación.

10 i) escisión química

[0039] El término "escisión química" engloba cualquier procedimiento que utilice un ácido no nucleico y un reactivo químico no enzimático con objeto de promover/conseguir la escisión de una o de ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario. Si fuera necesario, una o ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario
15 pueden incluir una o más fracciones químicas no nucleotídicas y/o nucleótidos no naturales y/o uniones de esqueleto no naturales con objeto de permitir una reacción de escisión química en un sitio de escisión predeterminado.

[0040] En una forma de realización preferida, pero no limitante, una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario puede incluir un conector de diol que permite la escisión mediante el tratamiento con peryodato (por
20 ejemplo, peryodato sódico). El conector de diol puede estar ubicado en un sitio de escisión predeterminado, cuya ubicación precisa puede ser elegida por el usuario. Se apreciará que podría incluirse más de un diol en el sitio de escisión.

[0041] Las unidades conectoras de diol basadas en la química del fosfoamidito adecuadas para su incorporación
25 en cadenas de polinucleótidos están disponibles comercialmente en Fidelity systems Inc. (Gaithersburg, MD, EE.UU.). Pueden incorporarse una o más unidades de diol en un polinucleótido usando procedimientos estándar para la síntesis química automática de ADN.

[0042] Con objeto de ubicar el conector de diol a una distancia óptima del soporte sólido pueden incluirse una o
30 más moléculas separadoras entre el conector de diol y el lugar de unión al soporte sólido. La molécula separadora puede ser una fracción química no nucleotídica. Las unidades conectoras de diol basadas en la química del fosfoamidito adecuadas para su uso junto con los conectores de diol también son suministradas por Fidelity Systems Inc. Un separador adecuado para su uso con conectores de diol es el separador denominado brazo 26, identificado
35 en los ejemplos anexos. El brazo 26 puede modificarse para que incluya un grupo fosforotioato en el extremo 5' de la hebra de polinucleótidos sobre un soporte sólido. El grupo fosforotioato puede unirse fácilmente durante la síntesis química de una cadena de "polinucleótidos" que incluye el separador y las unidades de diol.

[0043] Podrían usarse otras moléculas separadoras alternativas al brazo 26. Por ejemplo, puede incluirse una
40 ampliación de nucleótidos "separadores" no objetivo. Típicamente pueden incluirse entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 15 o entre 1 y 10, y más particularmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos separadores. Muy preferiblemente se ubicarán 10 nucleótidos separadores entre el punto de unión de la hebra de polinucleótidos al soporte sólido (típicamente el extremo 5') y el conector de diol. Se prefiere usar separadores de poliT, aunque pueden usarse otros nucleótidos y combinaciones de los mismos. En una forma de realización preferida, la hebra
45 que se va escindir puede incluir nucleótidos separadores de 10T secuencia arriba del conector de diol.

[0044] El conector de diol se escinde mediante el tratamiento con un "agente de escisión", que puede ser cualquier
50 sustancia que promueva la escisión del diol. El agente de escisión preferido es el peryodato, preferiblemente peryodato sódico acuoso (NaIO₄). Tras el tratamiento con el agente de escisión (por ejemplo, peryodato) para escindir el diol, el producto escindido puede tratarse con un "agente de terminación de cadena" con objeto de neutralizar las especies reactivas generadas en la reacción de escisión. Los agentes de terminación de cadena
55 adecuados para este propósito incluyen aminas, tales como etanolamina. Ventajosamente, el agente de terminación de cadena (por ejemplo, etanolamina) puede incluirse en una mezcla con el agente de escisión (por ejemplo, peryodato) de forma que las especies reactivas estén limitadas tan pronto como se forman.

[0045] Se prefiere la combinación de un conector de diol y un agente de escisión (por ejemplo, peryodato) para
60 conseguir la escisión de una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenario para la linealización de las moléculas de ácidos nucleicos sobre soportes sólidos de hidrogeles de poliacrilamida porque el tratamiento con peryodato es compatible con la integridad de los ácidos nucleicos y con la química de la superficie del hidrogel. Sin embargo, la invención no pretende estar limitada al uso de conectores de diol/periodato como un procedimiento de linealización sobre superficies de hidrogel de poliacrilamida, sino que también se extiende al uso de este
65 procedimiento de escisión para la linealización de ácidos nucleicos inmovilizados sobre otras superficies, incluyendo soportes recubiertos con silanos funcionalizados (etc.).

ii) escisión de sitios abásicos en una molécula bicatenaria

65

[0046] Un "sitio abásico" se define como la posición de un nucleósido en una cadena de polinucleótidos en la que se ha eliminado el componente de base. Los sitios abásicos pueden aparecer de forma natural en el ADN en condiciones fisiológicas por la hidrólisis de residuos nucleosídicos, pero también pueden formarse químicamente en condiciones artificiales o mediante la acción de enzimas. Una vez formados, los sitios abásicos pueden ser
5 escindidos (por ejemplo, mediante el tratamiento con una endonucleasa u otra enzima de escisión monocatenaria, por exposición a calor o a álcalis), proporcionando un medio para la escisión específica de sitio de una hebra de polinucleótido.

[0047] En una forma de realización preferida, pero no limitante, puede crearse un sitio abásico en una posición
10 predeterminada en una hebra de un polinucleótido bicatenario, y después escindirse incorporando en primer lugar desoxiuridina (U) en un sitio de escisión predeterminado de la molécula de ácido nucleico bicatenario. Esto puede conseguirse, por ejemplo, incluyendo U en uno de los cebadores usados para la preparación de la molécula de ácido nucleico bicatenario mediante amplificación por PCR en fase sólida. Entonces puede usarse la enzima uracilglucosilasa de ADN (UDG) para eliminar la base de uracilo, generando un sitio abásico en una hebra. La hebra
15 de polinucleótido que incluye un sitio abásico puede escindirse entonces en el sitio abásico mediante tratamiento con una endonucleasa (por ejemplo, endonucleasa EndoIV, liasa AP, glucosilasa FPG / liasa AP, glucosilasa EndoVIII / liasa AP), calor o álcalis.

[0048] Los sitios abásicos también pueden generarse en desoxirribonucleótidos no naturales/modificados distintos
20 a la desoxiuridina y escindirse de una forma análoga mediante tratamiento con endonucleasa, calor o álcalis. Por ejemplo, puede convertirse la 8-oxo-guanina en un sitio abásico mediante la exposición a glucosilasa FPG. La desoxiinosina puede convertirse en un sitio abásico mediante la exposición a glucosilasa AlkA. Los sitios abásicos así generados pueden escindirse entonces, típicamente, mediante el tratamiento con una endonucleasa adecuada (por ejemplo, EndoIV, liasa AP). Si la molécula de ácido nucleico bicatenario se forma mediante una amplificación
25 por PCR en fase sólida usando un cebador de amplificación que comprende el nucleósido no natural/modificado pertinente, entonces en esta forma de realización es esencial que el nucleótido no natural/modificado sea susceptible de ser copiado por la polimerasa usada para la reacción de amplificación.

[0049] En una forma de realización, las moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que se van a escindir pueden
30 exponerse a una mezcla que contiene la glucosilasa apropiada (para generar el sitio abásico) y una o más endonucleasas adecuadas (para escindir a continuación). En dichas mezclas, la glucosilasa y la endonucleasa estarán presentes típicamente en una proporción de actividad de al menos aproximadamente 2:1.

[0050] La escisión de ácidos nucleicos bicatenarios en sitios abásicos predeterminados tiene ventajas particulares
35 en relación con la creación de moldes para la secuenciación de ácidos nucleicos. En particular, la escisión en un sitio abásico generado por el tratamiento con una glucosilasa tal como UDG genera un grupo hidroxilo libre en 3' en la hebra escindida que puede proporcionar un punto de inicio para secuenciar una región de la hebra complementaria. Además, si el ácido nucleico bicatenario de partida contiene únicamente una base escindible (por ejemplo, uracilo) en una hebra, entonces puede generarse un único "corte" en una posición única en esta hebra del
40 dúplex. Dado que la reacción de escisión requiere un residuo, por ejemplo, desoxiuridina, que no aparece de forma natural en el ADN, pero que por lo demás es independiente del contexto de la secuencia, si solo se incluye una base no natural no hay posibilidad de que se produzca la escisión mediada por glucosilasa en otro sitio en posiciones indeseadas del dúplex. Por el contrario, cuando el ácido nucleico bicatenario que se va a escindir con una endonucleasa "de corte" que reconoce una secuencia específica, hay una posibilidad de que la enzima pueda crear
45 cortes en otras zonas del dúplex (además del sitio de escisión deseado) si posee la secuencia de reconocimiento correcta. Esto podría suponer un problema si los cortes se crean en la hebra destinada a secuenciar en lugar de en la hebra que será eliminada total o parcialmente para crear el molde de secuenciación, y es un riesgo en particular si la porción objetivo de la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene una secuencia desconocida.

[0051] El hecho de que no se requiera un residuo no natural (por ejemplo, uracilo) ubicado en un contexto de
50 secuencia detallado con objeto de proporcionar un sitio para la escisión usando esta metodología es por sí mismo ventajoso. En particular, si el sitio de escisión se va a incorporar en un cebador de amplificación para ser usado en la producción de una matriz agrupada mediante amplificación en fase sólida, es necesario únicamente sustituir un nucleótido natural de cebador (por ejemplo, T) por un nucleótido no natural (por ejemplo, U) con objeto de permitir la
55 escisión en un sitio de escisión predeterminado. Ya no hay necesidad de diseñar el cebador para que incluya una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción de numerosos nucleótidos de longitud. Los cebadores oligonucleotídicos que incluyen nucleótidos de U, y los demás nucleótidos naturales enumerados anteriormente, pueden prepararse fácilmente usando técnicas y aparatos convencionales para la síntesis química de oligonucleótidos.

[0052] Otra ventaja conseguida mediante la escisión de sitios abásicos de la molécula bicatenaria generada por la
60 acción de la UDG sobre uracilo es que la primera base incorporada en una reacción de "secuenciación mediante síntesis" que se inicia en el grupo hidroxilo libre en 3' formado por la escisión en dicho sitio siempre será T. Por lo tanto, si la molécula de ácido nucleico bicatenario forma parte de una matriz agregada formada por otras muchas
65 moléculas, todas las cuales son escindidas de esta forma para producir moldes de secuenciación, entonces la

primera base incorporada universalmente por toda la matriz será T. Esto puede proporcionar un ensayo independiente de la secuencia para la intensidad del agregado en el inicio de una "tanda" de secuenciación.

iii) escisión de ribonucleótidos

5

[0053] La incorporación de uno o más ribonucleótidos en una hebra de polinucleótidos que por otro lado está formada por desoxirribonucleótidos (con o sin fracciones químicas no nucleotídicas adicionales, bases no naturales o uniones de esqueleto no naturales), puede proporcionar un sitio predeterminado de escisión usando un agente químico capaz de escindir selectivamente el enlace fosfodiéster entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido, o usando una ribonucleasa (ARNasa). Por lo tanto, la invención también engloba la producción de moldes de secuenciación mediante la escisión de una hebra (de una molécula de ácido nucleico bicatenario) en un sitio que contiene uno o más ribonucleótidos consecutivos usando un agente de escisión química o una ARNasa. Preferiblemente, la hebra que se va a escindir contiene un único ribonucleótido para proporcionar un sitio predeterminado para la escisión química.

15

[0054] Algunos agentes de escisión química adecuados capaces de escindir selectivamente el enlace fosfodiéster entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido incluyen iones metálicos, por ejemplo, iones de metales lantánidos (especialmente La^{3+} , particularmente Tm^{3+} , Yb^{3+} ó Lu^{3+} (Chen y col. Biotechniques. 2002, 32: 518 - 520; Komiyama y col. Chem. Commun. 1999, 1443 - 1451)), Fe (3) ó Cu (3), o la exposición a un pH elevado, por ejemplo, mediante el tratamiento con una base tal como hidróxido sódico. Por "escisión selectiva del enlace fosfodiéster entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido" se entiende que el agente de escisión química no es capaz de escindir el enlace fosfodiéster entre dos desoxirribonucleótidos en las mismas condiciones.

20

[0055] La composición de base del (los) ribonucleótido(s) generalmente no es esencial, pero puede elegirse con objeto de optimizar la escisión química (o enzimática). A modo de ejemplo, generalmente se prefieren rUMP ó rCMP si la escisión va llevarse a cabo mediante la exposición a iones metálicos, especialmente a iones de metales lantánidos.

25

[0056] El (los) ribonucleótido(s) se incorporará(n) típicamente en una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario, y puede(n) situarse en una región de la misma que sea monocatenaria cuando las dos hebras de la molécula bicatenaria están hibridadas (es decir, en una porción saliente en 5'). En particular, si la molécula de ácido nucleico bicatenario se prepara mediante amplificación mediante PCR en fase sólida usando cebadores de amplificación directos e inversos, uno de los cuales contiene al menos un ribonucleótido, las enzimas estándar de polimerasa de ADN usadas para la amplificación mediante PCR no son capaces de copiar los moldes de ribonucleótidos. Por lo tanto, los productos de la reacción de PCR en fase sólida contendrán una región saliente en 5' que comprende el (los) ribonucleótido(s) y cualquier remanente del cebador de amplificación secuencia arriba del (los) ribonucleótido(s).

30

[0057] El enlace fosfodiéster entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido, o entre dos ribonucleótidos también puede ser escindido por una ARNasa. Para este propósito puede usarse cualquier ribonucleasa endocítica con una especificidad de sustrato apropiada. Si el (los) ribonucleótido(s) está(n) presente(s) en una región que es monocatenaria cuando hibridan las dos moléculas complementarias (es decir, en una porción saliente en 5'), entonces la ARNasa será una endonucleasa que tenga especificidad por las hebras individuales que contienen ribonucleótidos. Para la escisión con ribonucleasa se prefiere incluir dos o más ribonucleótidos consecutivos, y preferiblemente entre 2 y 10 o entre 5 y 10 ribonucleótidos consecutivos. La secuencia precisa de los ribonucleótidos generalmente no es esencial, excepto porque algunas ARNasas tienen especificidad por la escisión después de cierto sus residuos. Las ARNasa adecuadas incluyen, por ejemplo, ARNasa A, que escinde después de residuos C y U. Por lo tanto, cuando se escinde con ARNasa, el sitio de escisión debe incluir al menos un ribonucleótido que sea C ó U.

40

[0058] Los polinucleótidos que incorporan uno o más ribonucleótidos pueden sintetizarse fácilmente usando técnicas estándar para la síntesis química de oligonucleótidos con los apropiados precursores de ribonucleótidos. Si la molécula de ácido nucleico bicatenario se prepara mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida, entonces es conveniente incorporar uno o más ribonucleótidos en uno de los cebadores que se van a usar para la reacción de amplificación.

45

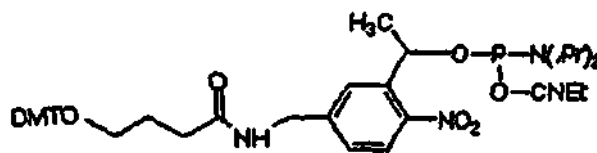
iv) escisión fotoquímica

[0059] El término "escisión fotoquímica" engloba cualquier procedimiento que utiliza la energía lumínica con objeto de conseguir la escisión de una o de ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario.

50

[0060] Puede proporcionarse un sitio predeterminado para la escisión fotoquímica mediante una unidad separadora química no nucleotídica en una de las hebras de la molécula bicatenaria. Algunos separadores fotoquímicos escindibles adecuados incluyen el separador PC de fosfoamidito (4-(4,4'-

dimetoxitritiloxi)butiramidometil)-1-(2-nitrofenil)-etil]-2-cianoetil-(N,N-diisopropil)-fosforamidito) suministrado por Glen Research, Sterling, Virginia, Estados Unidos (número de catálogo 10-4913-XX) que tiene la estructura:



5

[0061] La unidad separadora puede ser escindida mediante exposición a una fuente de luz UV.

[0062] Esta unidad separadora puede unirse al extremo 5' de un polinucleótido, junto con un grupo tiofosfato, que permite la unión a una superficie sólida, usando técnicas estándares de síntesis química de oligonucleótidos.

10 **[0063]** Convenientemente, esta unidad separadora puede incorporarse en un cebador de amplificación directo o inverso para usarse en la síntesis de una molécula de ácido nucleico bicatenaria fotoescindible mediante amplificación en fase sólida.

v) escisión de ADN semimetilado

15

[0063] La escisión específica de sitio de una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenario también puede conseguirse mediante la incorporación de uno o más nucleótidos metilados en esta hebra, y escindiendo después con una enzima endonucleasa específica para una secuencia de reconocimiento que incluye el (los) nucleótido(s) metilado(s).

20

[0064] El (los) nucleótido(s) metilado(s) se incorporará(n) típicamente en una región monocatenaria de la molécula de ácido nucleico bicatenario con una ampliación complementaria de desoxirribonucleótidos no metilados en la hebra complementaria, de forma que el apareamiento de las dos hebras produce una estructura en dúplex semimetilada. El dúplex semimetilado puede escindirse entonces mediante la acción de una endonucleasa adecuada. Para evitar dudas, las enzimas que escinden dichas secuencias objetivos semimetiladas no se consideran como "endonucleasas de restricción", excluidas del ámbito del segundo aspecto de la invención, sino que están destinadas a formar parte del asunto en cuestión de la invención.

25

[0065] Los polinucleótidos que incorporan uno o nucleótidos metilados pueden prepararse usando técnicas estándar para la síntesis automatizada de ADN, usando apropiadamente precursores de nucleótidos metilados. Si la molécula de ácido nucleico bicatenario se prepara mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida, entonces es conveniente incorporar uno o más nucleótidos metilados en uno de los cebadores que se van a usar para la reacción de amplificación.

30

35 vi) finalizadores de PCR

[0066] En otra forma de realización de la invención, el ácido nucleico bicatenario puede prepararse mediante amplificación en fase sólida usando cebadores directos e inversos, uno de los cuales contiene un "finalizador de PCR". Un "finalizador de PCR" es cualquier fracción (nucleótido o no nucleótido) que evita la ultralectura por parte de la polimerasa usada para la amplificación, de forma que no puede copiar más allá de ese punto. El resultado es que las hebras amplificadas derivadas por la extensión del cebador que contiene el finalizador de PCR contendrán una porción saliente en 5'. Este saliente en 5' (distinto al propio finalizador de PCR) puede estar formado por desoxirribonucleótidos naturales, predominantemente con uniones de esqueleto naturales, es decir, simplemente puede ser una ampliación de un ADN monocatenario. Entonces la molécula puede ser escindida en la región saliente en 5' mediante el uso de un reactivo de escisión (por ejemplo, una enzima) que sea selectiva para la escisión del ADN monocatenario pero no del ADN bicatenario, por ejemplo nucleasa S1 de *Aspergillus*.

40

45

[0067] El finalizador de PCR puede ser esencialmente cualquier fracción que evite la ultralectura de la polimerasa que se va a usar para la reacción de amplificación. Algunos finalizadores de PCR adecuados incluyen, pero no se limitan a, hexaetilenglicol (HEG), sitios abásicos y cualquier nucleótido no natural o modificado que evite la ultralectura de la polimerasa, incluyendo análogos de ADN tales como ácido nucleicos peptídico (PNA).

50

[0068] Pueden introducirse sitios abásicos estables durante la síntesis química de oligonucleótidos usando unidades separadoras apropiadas que contienen el sitio abásico estable. A modo de ejemplo, pueden incorporarse separadores abásicos de furano (5'-O-dimetoxitritil-1',2'-didesoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito) disponibles comercialmente en Glen Research, Sterling, Virginia, Estados Unidos, durante la síntesis química del oligonucleótido con objeto de introducir un sitio abásico. Dicho sitio puede por lo tanto introducirse fácilmente en un cebador oligonucleotídico que se va a usar en una amplificación en fase sólida. Si se incorpora un sitio abásico en un cebador de amplificación directa o inversa, el producto resultante de la amplificación tendrá un saliente en 5' en una hebra que incluirá el sitio abásico (en la forma monocatenaria). El sitio abásico monocatenario

55

60

puede escindirse entonces por la acción de un agente químico adecuado (por ejemplo, exposición a un álcali) o una enzima (por ejemplo, endonucleasa AP-VI, Shida y col. *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, 4572 - 4576).

vii) escisión de un péptido conector

5

[0069] También puede introducirse un sitio de escisión en una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario preparando una estructura conjugada en la que se une una molécula peptídica a una hebra de la molécula de ácido nucleico. La molécula peptídica puede ser escindida subsiguientemente por una enzima peptidasa con la especificidad apropiada, o mediante cualquier otro medio adecuado de escisión química no enzimática o fotoquímica. Típicamente, el conjugado entre el péptido y el ácido nucleico se formará uniendo covalentemente el péptido sólo a una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario, estando conjugada la porción peptídica al extremo 5' de esta hebra, adyacente al punto de unión a la superficie sólida. Si el ácido nucleico bicatenario se prepara mediante amplificación en fase sólida, el conjugado peptídico puede incorporarse en el extremo 5' de uno de los cebadores de amplificación. Obviamente, el componente peptídico de este cebador no será copiado durante la amplificación por PCR, por lo que el producto de la amplificación "en puente" incluirá un péptido escindible en 5' "sobresaliendo" de una hebra.

[0070] Los conjugados entre péptidos y ácidos nucleicos en los que el péptido está conjugado en el extremo 5' del ácido nucleico pueden prepararse usando técnicas conocidas generalmente en la materia. En una de dichas técnicas, los componentes de péptido y de ácido nucleico de la secuencia deseada de aminoácidos y nucleótidos pueden sintetizarse por separado, por ejemplo, mediante técnicas automatizadas de síntesis química estándar, y conjugarse después en una disolución acuosa amoníaco genera en disolución oligonucleótidos funcionalizados con 5'-S-terc-butilsulfenil-L-cisteinilo. El tiobencilo terminal del Péptido Modificado se convierte en el análogo de tiofenilo mediante el uso de tiofenol, mientras que el Oligonucleótido Modificado se reduce usando tris(carboxietil)fosfina. El acoplamiento de estos dos intermedios, seguido por la etapa de "unión nativa", conduce a la formación del Conjugado Oligonucleótido-Péptido.

[0071] La hebra conjugada que contiene el péptido y el ácido nucleico puede unirse covalentemente a un soporte sólido usando cualquier técnica de unión covalente adecuada conocida en la materia que sea compatible con la superficie elegida. Por ejemplo, la unión covalente a una superficie de hidrogel de poliacrilamida soportada sobre un sólido puede conseguirse mediante la inclusión de un grupo tiofosfato en el extremo "libre" del componente peptídico (es decir, el extremo no conjugado con el ácido nucleico). Si la estructura del conjugado de péptido/ácido nucleico es un cebador de amplificación que se va a usar para una amplificación mediante PCR en fase sólida, la unión al soporte sólido debe dejar libre el extremo 3' del componente ácido nucleico.

[0072] El componente peptídico puede diseñarse para que sea escindible por cualquier enzima peptidasa elegida, de las que muchas son conocidas en la materia. La naturaleza de la peptidasa no está particularmente limitada, sólo es necesaria para que la peptidasa escinda en algún sitio del componente peptídico. De forma similar, la longitud de la secuencia de aminoácidos del componente peptídico no está particularmente limitada, excepto porque se requiere que sea "escindible" por la peptidasa elegida.

[0073] La longitud y la secuencia precisa del componente de ácido nucleico tampoco están particularmente limitadas, pueden ser de cualquier secuencia deseada. Si el componente de ácidos nucleico va a funcionar como un cebador en una PCR en fase sólida, entonces su longitud y secuencia de nucleótidos se elegirán para permitir el apareamiento con el molde que se va a amplificar.

Desnaturalización

55

[0074] En todas las formas de realización de la invención, independientemente del procedimiento usado para la escisión, el producto de la reacción de escisión puede someterse a condiciones desnaturalizantes con objeto de eliminar el (las) porción(es) de la hebra escindida que no están unidas al soporte sólido. Las condiciones desnaturalizantes adecuadas serán evidentes para el lector experto con referencia a los protocolos de biología molecular estándar (Sambrook y col., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; *Current Protocols*, eds. Ausubel y col.).

[0075] La desnaturalización (y el subsiguiente reapareamiento de las hebras escindidas) da como resultado la producción de un molde de secuenciación que es parcialmente o sustancialmente monocatenario. Entonces puede

iniciarse una reacción de secuenciación mediante la hibridación de un cebador de secuenciación con la porción monocatenaria del molde.

5 **[0076]** En otras formas de realización de la invención, puede iniciarse directamente la secuenciación después de la etapa de escisión sin necesidad de desnaturalización para eliminar una porción de la(s) hebra(s) escindida(s). Si la etapa de escisión genera un grupo hidroxilo libre en 3' en una de las hebras escindidas aún hibridada con una hebra complementaria, entonces puede proceder la secuenciación a partir de este punto usando una enzima polimerasa por desplazamiento de hebra sin la necesidad de una etapa de desnaturalización inicial. En particular, puede usarse la secuenciación por desplazamiento de hebra junto con la generación del molde mediante la escisión con
10 endonucleasas de corte, o mediante la hidrólisis de un sitio abásico con una endonucleasa, calor o un tratamiento alcalino.

Características de los soportes sólidos

15 **[0077]** En todas las formas de realización de la invención, el término "soporte sólido", según se usa en este documento, se refiere al material al que se unen las moléculas de polinucleótidos. Algunos soportes sólidos están disponibles comercialmente, y será evidente para la persona experta. Los soportes pueden elaborarse a partir de materiales tales como vidrio, cerámica, sílice y silicio. También pueden usarse soportes con una superficie de oro. Los soportes comprenden habitualmente una superficie plana, o al menos, una estructura en la que los
20 polinucleótidos que se van a interrogar están aproximadamente en el mismo plano. Alternativamente, el soporte sólido puede no ser plano, por ejemplo, una microperla. Puede usarse cualquier tamaño adecuado. Por ejemplo, los soportes podrían ser del orden de 1 - 10 cm en cada dirección.

25 **[0078]** El primer aspecto de la invención se refiere a la generación de moldes de secuenciación sobre un tipo particular de superficie, a saber, hidrogeles de poli(acrilamida) sobre soporte sólido.

[0079] Como se dijo anteriormente, al preparar las matrices moleculares basadas en hidrogel sobre soporte sólido, se forma un hidrogel, y las moléculas se despliegan a partir de él. Estas dos características - formación del hidrogel y construcción de la matriz - pueden realizarse secuencialmente o simultáneamente.

30 **[0080]** Cuando el hidrogel se forma antes de la formación de la matriz, típicamente se produce dejando polimerizar una mezcla de comonomeros. Generalmente, la mezcla de comonomeros contiene acrilamida y uno o más comonomeros, el último de los cuales permite, en parte, la subsiguiente inmovilización de las moléculas de interés para que formen la matriz molecular.

35 **[0081]** Los comonomeros usados para crear el hidrogel contienen típicamente una funcionalidad que sirve para participar en la reticulación del hidrogel y/o la inmovilización del hidrogel sobre el soporte sólido, y facilitan la asociación con las moléculas objetivo de interés.

40 **[0082]** Generalmente, como se sabe en la materia, los hidrogeles de poli(acrilamida) se producen como finas láminas tras la polimerización de disoluciones acuosas de una disolución de acrilamida. Generalmente hay presente un agente de reticulación poliinsaturado (tal como bisacrilamida); la proporción entre acrilamida y bisacrilamida es generalmente de aproximadamente 19:1. Dichos procedimientos de moldeo son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor
45 Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) y no requieren ser analizados aquí con detalle.

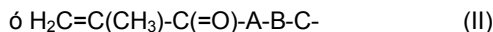
[0083] Puede practicarse alguna forma de modificación superficial covalente del soporte sólido con objeto de conseguir una inmovilización satisfactoria de matrices moleculares basadas en hidrogel o de hidrogeles en los que se desea formar una matriz molecular. Sin embargo, los inventores han observado que dicha modificación funcional del soporte no es necesaria con objeto de conseguir una inmovilización satisfactoria de matrices de polinucleótidos. Con objeto de elaborar matrices soportadas útiles capaces de unir moléculas de interés, puede polimerizarse una mezcla de comonomeros que comprende al menos un monómero hidrófilo y un comonomero funcionalizado (funcionalizado hasta el punto de que el monómero, una vez incorporado en el polímero, es capaz de unir la molécula de interés a la superficie del hidrogel) para formar un hidrogel susceptible de ser inmovilizado sobre un
50 soporte sólido, preferiblemente un sustrato basado en sílice. En particular, el hidrogel puede estar sustancialmente exento de cualquier componente ligante de silano.

[0084] En una forma de realización, el hidrogel puede formarse mediante un procedimiento que comprende la polimerización, sobre dicho soporte, de una mezcla de:

60 (i) un primer comonomero que es acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo o N-vinil pirrolidinona;
y
(ii) un segundo comonomero que es una acrilamida funcionalizada o un acrilato de fórmula (I):

65
$$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{A}-\text{B}-\text{C} \quad (\text{I});$$

ó un metacrilato o una metacrilamida de fórmula (II):



5 (en las que:

A es NR u O, en la que R es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo saturado opcionalmente sustituido que comprende entre 1 y 5 átomos de carbono;

10 -B- es un birradical alquileo opcionalmente sustituido de fórmula $-(\text{CH}_2)_n-$ en la que n es un número entero entre 1 y 50; y en la que n = 2 o más, uno o más birradicales etileno opcionalmente sustituidos - CH_2CH_2- de dicho birradical alquileo pueden sustituirse independientemente por fracciones de etenileno y etinileno; y en la que n = 1 o más, uno o más birradicales metileno $-\text{CH}_2-$ pueden sustituirse independientemente por un birradical hidrocarbonado mono o policíclico opcionalmente sustituido que comprende entre 4 y 50 átomos de carbono, o un correspondiente birradical heteromonocíclico o heteropolicíclico en el que al menos 1 CH_2 ó CH_2 está sustituido por un átomo de oxígeno, de azufre o de nitrógeno, o un grupo NH; y

15 C es un grupo para la reacción con un compuesto, para unir covalentemente dicho compuesto a dicho hidrogel) para formar un producto polimerizado,

20 caracterizada porque dicho procedimiento se lleva a cabo en, e inmoviliza el producto polimerizado a, dicho soporte que no está modificado covalentemente en su superficie.

25 **[0085]** Se ha averiguado que la omisión de una etapa de modificación covalente de la superficie (particularmente del soporte sólido) proporciona una superficie con una pasividad mayor que en la técnica anterior, particularmente cuando se compara con aquellos casos en los que se emplea el uso de agentes modificadores de silano con sustratos basados en sílice descritos anteriormente.

30 **[0086]** El sólido sobre el que se soporta el hidrogel no está limitado a un sustrato o matriz en particular. Algunos soportes adecuados incluyen sustratos basados en sílice tales como vidrio, vidrio fundido y otros materiales que contienen sílice; también pueden ser hidruros de silicona o materiales plásticos tales como polietileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, nailones, poliésteres, policarbonatos y metacrilato de polimetilo. Algunos materiales plásticos preferidos son metacrilato de polimetilo, poliestireno y sustratos poliméricos de olefinas cíclicas. Alternativamente pueden usarse otros soportes sólidos tales como oro, dióxido de titanio o soportes de silicio. Las listas anteriores pretenden ser ilustrativas, pero no limitantes, de la invención. Preferiblemente, el soporte es un

35 material basado en sílice o un material plástico tal como los analizados en este documento.

40 **[0087]** Los procedimientos mediante los que se polimeriza la mezcla de comonomeros de la invención no son característicos de esta invención y serán conocidos por la persona experta (por ejemplo, mediante el recurso a Sambrook y col. (*supra*). Generalmente, sin embargo, la polimerización se realizará en un medio acuoso, y la polimerización será iniciada por un iniciador adecuado. Típicamente se emplea persulfato potásico o amónico como iniciador. Generalmente puede usarse y se usa tetrametiletlenodiamina (TMEDA o TEMED) para acelerar la polimerización.

45 **[0088]** No es necesario que haya presente un agente de reticulación poliinsaturado, tal como bisacrilamida o tetraacrilato de pentaeritrol, en la mezcla que polimeriza; tampoco es necesario formar intermedios de tipo PRP y reticularlos.

50 **[0089]** Generalmente, en la producción de los hidrogeles según esta invención, se usará un compuesto de las fórmulas (I) ó (II). El uso de un compuesto de las fórmulas (I) ó (II) permite la formación de un hidrogel susceptible de ser inmovilizado en soportes sólidos, preferiblemente en soportes basados en sílice. Los compuestos con estas fórmulas comprenden las porciones A, B y C según se definen en este documento.

55 **[0090]** El birradical A puede ser oxígeno o N(R) en el que R es hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-5} . Preferiblemente, R es hidrógeno o metilo, particularmente hidrógeno. Cuando R es un grupo alquilo C_{1-5} , éste puede contener uno o más, por ejemplo, de uno a tres sustituyentes. Preferiblemente, sin embargo, el grupo alquilo no está sustituido.

60 **[0091]** El birradical B es una fracción conectora predominantemente hidrófoba, que conecta A con C y puede ser un birradical alquileo de fórmula $-(\text{CH}_2)_n-$, en la que n es entre 1 y 50. Preferiblemente n es 2 o más, por ejemplo, 3 o más. Preferiblemente n es de 2 a 25, particularmente de 2 a 15, más particularmente de 4 a 12, por ejemplo, de 5 a 10.

[0092] Cuando n en $-(\text{CH}_2)_n-$ es 2 o más, uno o más birradicales $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (-etileno-) pueden sustituirse por birradicales etenileno o etinileno. Preferiblemente, sin embargo, el birradical B no contiene dicha insaturación.

- [0093]** Adicionalmente, o alternativamente, cuando n en $-(CH_2)_n-$ es 1 o más, uno o más radicales metileno $-CH_2-$ en B pueden sustituirse por un birradical mono o policíclico que comprende preferiblemente entre 5 y 10 átomos de carbono, por ejemplo, 5 ó 6 átomos de carbono. Dichos birradicales cíclicos pueden ser, por ejemplo, birradicales 1,4, 1,3 ó 1,2-ciclohexilo. También pueden emplearse radicales bicíclicos tales como naftilo o decahidronaftilo.
- 5 También pueden emplearse los birradicales cíclicos sustituidos con heteroátomos correspondientes a esos birradicales homocíclicos, por ejemplo, piridilo, piperidinilo, quinolinilo y decahidroquinolinilo.
- [0094]** Se apreciará que el ámbito de -B- no está por tanto particularmente restringido. Muy preferiblemente, sin embargo, -B es un simple birradical alquileno no sustituido y no saturado tal como un grupo alquileno C_3-C_{10} ,
10 óptimamente C_5-C_8 , tal como n-pentileno: $-(CH_2)_5-$.
- [0095]** Cuando se indica que un grupo alquilo (o alquileno, alquenileno etc) está (opcionalmente) sustituido, los sustituyentes pueden elegirse del grupo que comprende hidroxilo, halo (es decir, bromo, cloro, fluoro o yodo), carboxilo, aldehído, amina y similares. El birradical -B- preferiblemente no está sustituido o está sustituido por menos
15 de 10, preferiblemente menos de 5, por ejemplo, por 1, 2 ó 3 de dichos sustituyentes.
- [0096]** El Grupo C sirve para permitir la unión de las moléculas de interés tras la formación del hidrogel. La naturaleza del Grupo C no está por lo tanto esencialmente limitada siempre que contenga una funcionalidad que permita la reacción entre el hidrogel y las moléculas que se van a inmovilizar. Preferiblemente, dicha funcionalidad
20 no requerirá una modificación previa a la reacción con la molécula de interés, y por lo tanto el grupo C está listo para una reacción directa tras la formación del hidrogel. Preferiblemente, dicha funcionalidad es hidroxilo, tiol, amina, ácido (por ejemplo, ácido carboxílico), éster y haloacetamido, y haloacetamido en particular, siendo particularmente preferido bromoacetamido. Otros grupos C apropiados serán evidentes para los expertos en la materia, e incluyen grupos que comprenden un único doble enlace carbono-carbono que puede ser terminal (es decir, cuando un grupo
25 C tiene un extremo que termina en un doble enlace carbono-carbono) o cuando el doble enlace carbono-carbono no está en un extremo terminal. Cuando un grupo C comprende un doble enlace carbono-carbono, éste está preferiblemente totalmente sustituido con grupos alquilo C_{1-5} , preferiblemente grupos metilo o etilo, de forma que ningún átomo de carbono de la fracción $C=C$ porte un átomo de hidrógeno.
- 30 **[0097]** La fracción C puede comprender, por tanto, por ejemplo, una fracción dimetilmaleimida según se desvela en los documentos US 6.372.813, WO01/01143, WO02/12566 y WO03/014394.
- [0098]** La (met)acrilamida o el (met)acrilato de fórmula (I) o (II) que son copolimerizados con acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo o N-vinilpirrolidinona, es preferiblemente una acrilamida o un acrilato, es
35 decir, de fórmula (I). Más preferiblemente es una acrilamida, y aún más preferiblemente es una acrilamida en la que A es NH.
- [0099]** Se ha averiguado que la reacción entre un comonomero de fórmula (I) o (II) y acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo o metacrilamida de N-vinilpirrolidinona, particularmente acrilamida, proporciona hidrogeles
40 particularmente adecuados para su uso en la generación de matrices moleculares. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que pueden formarse copolímeros análogos mediante la reacción entre los comonomeros de fórmula (I) o (II) y cualquier comonomero vinílico, siendo metacrilato de hidroxietilo y n-vinilpirrolidinona dos ejemplos de dichos comonomeros vinílicos.
- 45 **[0100]** El control de la proporción entre el monómero de fórmula (I) o (II) y la del primer comonomero (por ejemplo, acrilamida y/o metacrilamida, preferiblemente acrilamida) permite el ajuste de las propiedades físicas del hidrogel obtenido en la polimerización. Se prefiere que el comonomero de fórmula (I) o (II) esté presente en una cantidad de ≥ 1 mol%, preferiblemente ≥ 2 mol% (relativa a la cantidad molar total de comonomeros) con objeto de que el hidrogel
50 tenga una estabilidad térmica y química óptima en las condiciones que aparecen típicamente durante la preparación, y la subsiguiente manipulación, de las matrices moleculares producidas a partir de hidrogeles. Preferiblemente, la cantidad del comonomero de fórmula (I) o (II) es menor o igual a aproximadamente 5 mol%, más preferiblemente menor igual a aproximadamente 4 mol%. Las cantidades típicas del comonomero de fórmula (I) o (II) usadas son 1,5 - 3,5 mol%, ejemplificadas en este documento por aproximadamente el 2% y aproximadamente el 3%.
- 55 **[0101]** Las cantidades de acrilamida o de metacrilamida a partir de las que se construyen principalmente los hidrogeles son aquellas usadas típicamente para formar hidrogeles, por ejemplo, desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 10% p/v, preferiblemente menos del 5 o el 6% p/v, por ejemplo, desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 2% p/v. De nuevo, por supuesto, la naturaleza precisa del hidrogel puede ser ajustada, en parte, mediante el control de la cantidad de acrilamida o metacrilamida usada.
60
- [0102]** Para formar los hidrogeles puede disolverse la acrilamida o la metacrilamida en agua y mezclarse con una disolución de un comonomero de fórmula (I) o (II). El último será convenientemente disuelto en un disolvente miscible con el agua, tal como dimetilformamida (DMF), o la propia agua. El disolvente más apropiado lo podrá elegir
65 la persona experta y debe depender de la estructura del comonomero de fórmula (I) o (II).

[0103] Los procedimientos mediante los que se sintetizan los monómeros de fórmula (I) o (II) serán evidentes para los expertos en la materia. A modo de ejemplo, a continuación se proporciona como ejemplo la síntesis de un monómero particularmente preferido (de fórmula (I) en la que $A = NH$, $-B = -(CH_2)_5-$ y $-C = -N(H)-C(=O)CH_2Br$.

5 **[0104]** Como se mencionó anteriormente, los procedimientos generales mediante los que se lleva a cabo la polimerización son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, generalmente se disuelve acrilamida o metacrilamida en agua purificada (por ejemplo, Milli Q) y separadamente se disuelve en agua purificada persulfato potásico o amónico. El comonomero de fórmula (I) o (II) puede disolverse convenientemente en un disolvente orgánico miscible con el agua, por ejemplo, glicerol, etanol, metanol, dimetilformamida (DMF) etc. Puede añadirse
10 TEMED según sea apropiado. Una vez formulada (se describe una preparación típica en los ejemplos), la mezcla se polimeriza con el menor retraso posible tras su formulación.

[0105] El proceso de polimerización puede realizarse mediante cualquier medio conveniente.

15 **[0106]** El segundo aspecto de la invención no está limitado con respecto a la naturaleza del soporte sólido, y puede usarse junto con esencialmente cualquier tipo de soporte conocido en la materia para la producción de las matrices de polinucleótidos, y más específicamente con cualquier tipo de soporte que sea compatible con la amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida. Algunos soportes adecuados incluyen aquellos recubiertos con silanos funcionalizados. En particular, el procedimiento del segundo aspecto de la invención puede usarse junto con
20 los soportes sólidos recubiertos de silano descritos en los documentos WO 98/44151 y WO 00/18957.

Construcción de matrices mediante amplificación en fase sólida

[0107] En una forma de realización particular de la invención, pueden usarse los procedimientos según el primer y
25 el segundo aspecto de la invención para preparar moldes para el inicio de la secuenciación a partir de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios presentes en matrices agregadas de colonias de ácidos nucleicos generadas mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida. En este contexto, el término "amplificación en fase sólida" se refiere a una reacción de amplificación que es análoga a la PCR estándar, excepto porque los cebadores de amplificación directos e inversos están inmovilizados en (por ejemplo, unidos covalentemente a) un soporte sólido en, o cerca de,
30 el extremo 5'. Los productos de la reacción de PCR son por lo tanto hebras extendidas derivadas por extensión de los cebadores de amplificación que están inmovilizados sobre el soporte sólido en, o cerca de, el extremo 5'. La propia amplificación en fase sólida puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando procedimientos análogos a los descritos en los documentos WO 98/44151 y WO 00/18957,

35 **[0108]** Como primera etapa en la generación de colonias mediante amplificación en fase sólida, una mezcla de cebadores de amplificación directos e inversos puede inmovilizarse o "injertarse" en la superficie de un soporte sólido adecuado. La etapa de injerto implicará generalmente la unión covalente de los cebadores al soporte en, o cerca de, el extremo 5', dejando el extremo 3' libre para la extensión de cebador.

40 **[0109]** Los cebadores de amplificación son típicamente moléculas de oligonucleótidos con las siguientes estructuras:

Cebador directo: A-L-S1
Cebador inverso: A-L-S2

45

[0110] En las que A representa una fracción que permite la unión a un soporte sólido, L representa una fracción conectora opcional, y S1 y S2 son secuencias de polinucleótidos que permiten la amplificación de un sustrato de molécula de ácido nucleico que comprende una región objetivo que se desea secuenciar (total o parcialmente).

50 **[0111]** La mezcla de cebadores injertados en el soporte sólido comprenderá generalmente sustancialmente cantidades iguales de los cebadores directo e inverso.

[0112] El Grupo A puede ser cualquier fracción (incluyendo una modificación química no nucleotídica) que permita la unión (preferiblemente covalente) a un soporte sólido. En todos los aspectos de la invención, el grupo A puede
55 comprender un nucleófilo que contenga azufre, tal como fosforotioato, presente en el extremo 5' de una hebra de polinucleótidos. El medio más preferido para injertar cebadores en un soporte sólido es a través de la unión de fosforotioato en 5' a un hidrogel formado por acrilamida polimerizada y N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA).

60 **[0113]** L representa un conector o separador que puede incluirse, pero no es estrictamente necesario. El conector puede incluirse con objeto de asegurar que el sitio de escisión presente en las moléculas de polinucleótidos inmovilizadas, generado como resultado de la reacción de amplificación, está posicionado a una distancia óptima del soporte sólido, o el propio conector puede contener un sitio de escisión.

[0114] El conector puede ser una cadena carbonada tal como aquellas de fórmula $(CH_2)_n$ en la que "n" es desde 1 hasta aproximadamente 1.500, por ejemplo menos de aproximadamente 1.000, preferiblemente menos de 100, por ejemplo, de 2 - 50, particularmente de 5 - 25. Sin embargo, puede emplearse una variedad de otros conectores con la única restricción situada en sus estructuras y es que los conectores sean estables en las condiciones en las que
5 pretenden usarse subsiguientemente los polinucleótidos, por ejemplo, las condiciones usadas en la amplificación, escisión y secuenciación del ADN.

[0115] También pueden usarse conectores que no consistan únicamente en átomos de carbono. Dichos conectores incluyen polietilenglicol (PEG) con una fórmula general $(CH_2-CH_2-O)_m$, en la que m es desde
10 aproximadamente 1 hasta 600, preferiblemente menos de aproximadamente 500.

[0116] Los conectores formados principalmente a partir de cadenas de átomos de carbono y a partir de PEG pueden modificarse para que contengan grupos funcionales que interrumpen las cadenas. Algunos ejemplos de dichos grupos incluyen cetonas, ésteres, aminas, amidas, éteres, tioéteres, sulfóxidos, sulfonas. Por separado o en
15 combinación, con la presencia de dichos grupos funcionales pueden emplearse fracciones de alqueno, alquino, aromáticas o heteroaromáticas, o fracciones alifáticas cíclicas (por ejemplo, ciclohexilo). Los anillos de ciclohexilo o de fenilo pueden estar conectados, por ejemplo, a PEG o a una cadena de $(CH_2)_n$ a través de sus posiciones 1 y 4.

[0117] Como alternativa a los conectores descritos anteriormente, que se basan principalmente en cadenas
20 lineales de átomos de carbono saturados, opcionalmente interrumpidas con átomos de carbono insaturados o con heteroátomos, pueden contemplarse otros conectores que se basan en unidades de ácidos nucleicos o de monosacáridos (por ejemplo, glucosa). También está en el ámbito de la invención utilizar péptidos como conectores.

[0118] En una forma de realización adicional, el conector puede comprender uno o más nucleótidos. Dichos
25 nucleótidos también pueden denominarse en este documento como nucleótidos "separadores". Típicamente pueden incluirse entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 15 o entre 1 y 10, y más particularmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos separadores. Muy preferiblemente, el cebador incluirá 10 nucleótidos separadores. Se prefiere usar separadores de poliT, aunque pueden usarse otros nucleótidos y combinaciones de los mismos. En una forma de
30 realización preferida, el cebador puede incluir nucleótidos separadores de 10T.

[0119] Para proceder a la reacción de injerto del cebador, se aplica una mezcla de los cebadores de amplificación
sobre un soporte sólido en unas condiciones que permitan la reacción entre la fracción A y el soporte. El soporte sólido puede funcionalizarse adecuadamente para permitir la unión covalente a través de la fracción A. El resultado
35 de la reacción de injerto es una distribución sustancialmente uniforme de los cebadores sobre el soporte sólido.

[0120] En ciertas formas de realización, el molde que se va a amplificar puede injertarse sobre el soporte sólido
junto con los cebadores de amplificación en una única reacción de injerto. Esto puede conseguirse añadiendo a la mezcla de cebadores moléculas de molde que incluyan la fracción A en el extremo 5' para formar una mezcla de
40 cebador-molde. Esta mezcla se injerta entonces sobre el soporte sólido en una única etapa. Entonces puede proceder la amplificación usando el molde y los cebadores inmovilizados en una reacción análoga a la descrita en el documento WO 00/18957. La primera etapa de dicha reacción será la hibridación entre los moldes unidos a la
superficie y los cebadores de amplificación unidos a la superficie.

[0121] Si únicamente se injerta una mezcla de cebadores en el soporte sólido, el molde que se va a amplificar
45 puede añadirse libre en disolución. Entonces puede proceder la amplificación sustancialmente según se describe en el documento WO 98/44151. Resumiendo, tras la unión de los cebadores al soporte sólido, se ponen en contacto con el molde que se va a amplificar en unas condiciones que permitan la hibridación entre el molde y los cebadores inmovilizados. Habitualmente el molde se añade libre en disolución en unas condiciones de hibridación adecuadas,
50 que serán apreciables por el lector experto. Las condiciones típicas de hibridación son, por ejemplo, 5 x SSC a 40°C, tras una etapa de desnaturalización inicial. Entonces puede proceder la amplificación en fase sólida, siendo la primera etapa una etapa de extensión del cebador en el que se añaden nucleótidos en el extremo 3' del cebador inmovilizado hibridado con el molde para producir una hebra complementaria completamente extendida. Esta hebra
complementaria incluirá por tanto en su extremo 3' una secuencia que es capaz de unirse a la segunda molécula de
cebador inmovilizada sobre el soporte sólido. Las rondas adicionales de amplificación (análogas a una reacción
55 estándar de PCR) conducen a la formación de agregados o colonias de moléculas de molde unidas al soporte sólido.

[0122] Las secuencias S1 y S2 de los cebadores de amplificación pueden ser específicas para un ácido nucleico
objetivo en particular que se desea a amplificar, pero en otras formas de realización, las secuencias S1 y S2 pueden
60 ser secuencias de cebado "universales" que permiten la amplificación de cualquier ácido nucleico objetivo con una secuencia conocida o desconocida que ha sido modificada para permitir la amplificación con los cebadores universales.

[0123] Los sustratos adecuados que se van a amplificar con cebadores universales pueden prepararse mediante la
65 modificación de polinucleótidos que comprenden la región objetivo que se va a amplificar (y secuenciar) mediante la

adición de secuencias adaptadoras conocidas en los extremos 5' y 3' de los polinucleótidos objetivo que se van a amplificar. Las propias moléculas objetivo pueden ser cualquier molécula de polinucleótido bicatenario que se desee secuenciar (por ejemplo, fragmentos aleatorios de ADN genómico humano). Las secuencias adaptadoras permiten la amplificación de estas moléculas sobre un soporte sólido para formar agregados usando cebadores directos e inversos con la estructura general descrita anteriormente, en la que las secuencias S1 y S2 son secuencias de un cebador universal.

[0124] Los adaptadores son típicamente oligonucleótidos cortos que pueden sintetizarse mediante medios convencionales. Los adaptadores pueden unirse a los extremos 5' y 3' de fragmentos de ácidos nucleicos objetivo mediante diversos medios (por ejemplo, subclonación, ligación, etc.). Más específicamente, se unen dos secuencias adaptadoras diferentes a una molécula de ácido nucleico objetivo que se va a amplificar de forma que un adaptador está unido en un extremo de la molécula de ácido nucleico objetivo y otro adaptador está unido en el otro extremo de la molécula de ácido nucleico objetivo. El constructo resultante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos objetivo flanqueada por adaptadores puede denominarse en este documento "constructo de ácido nucleico de sustrato".

[0125] Los polinucleótidos objetivo pueden ventajosamente fraccionarse por tamaños antes de la modificación con las secuencias adaptadoras.

[0126] Los adaptadores contienen secuencias que permiten la amplificación de los ácidos nucleicos usando moléculas cebadoras de la amplificación inmovilizadas sobre el soporte sólido. Estas secuencias de los adaptadores pueden denominarse en este documento "secuencias de unión del cebador". Con objeto de que actúen como molde para la amplificación de ácidos nucleicos, una única hebra del constructo de molde debe contener una secuencia que sea complementaria de la secuencia S1 de los cebadores de amplificación directos (de forma que la molécula del cebador directo pueda unirse y cebar la síntesis de una hebra complementaria) y una secuencia que se corresponda con la secuencia S2 de las moléculas del cebador de amplificación inverso (de forma que la molécula del cebador inverso pueda unirse a la hebra complementaria). Las secuencias de los adaptadores que permiten la hibridación con moléculas de cebadores tendrán típicamente aproximadamente 20 - 40 nucleótidos de longitud, aunque la invención no se limita a secuencias de esta longitud.

[0127] La identidad precisa de las secuencias S1 y S2 de los cebadores de amplificación, y por lo tanto, las secuencias cognadas de los adaptadores, generalmente no son relevantes para la invención, siempre que las moléculas del cebador sean capaces de interactuar con las secuencias de amplificación con objeto de dirigir la amplificación mediante PCR. Los criterios para el diseño de los cebadores de PCR son generalmente bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

[0128] La amplificación en fase sólida mediante el procedimiento análogo al del documento WO 98/44151 o al del documento WO 00/18957 dará como resultado la producción de una matriz agregada formada por colonias de productos de amplificación "en puente". Ambas hebras de los productos de amplificación estarán inmovilizadas sobre el soporte sólido en, o cerca de, el extremo 5', derivando esta unión de la unión original de los cebadores de amplificación. Típicamente, los productos de la amplificación de cada colonia derivarán de la amplificación de una única molécula de molde (objetivo).

[0129] Las modificaciones requeridas para permitir la subsiguiente escisión de los productos de amplificación en puente pueden incluirse ventajosamente en uno o en ambos cebadores de amplificación. Dichas modificaciones pueden ubicarse en cualquier sitio del cebador de amplificación, siempre que no afecte a la eficacia de la reacción de amplificación hasta un punto relevante. Por lo tanto, las modificaciones que permiten la escisión pueden formar parte de la región conectora L, o de una o ambas de las secuencias S1 o S2. A modo de ejemplo, los cebadores de amplificación pueden modificarse para que incluyan, *inter alia*, uniones de diol, nucleótidos de uracilo, ribonucleótidos, nucleótidos metilados, péptidos conectores, finalizadores de la PCR o secuencias de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. Debido a que todas las moléculas de ácido nucleico preparadas mediante amplificación en fase sólida contendrán finalmente secuencias derivadas de los cebadores de amplificación, cualquier modificación de los cebadores será portada por los productos amplificados.

[0130] Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida en el que se usan cebadores de amplificación directos e inversos unidos covalentemente a un soporte sólido por el extremo 5' para amplificar uno o más moldes de polinucleótidos, caracterizándose el procedimiento porque uno o ambos de los cebadores de amplificación incluye un sitio para la escisión mediante un procedimiento distinto a la digestión con una endonucleasa de restricción o con una endonucleasa de corte.

[0131] Las características preferidas de los cebadores de amplificación son según se describió anteriormente, y los procedimientos preferidos de escisión son según se describió anteriormente en relación con el primer y el segundo aspecto de la invención. Otras características preferidas descritas en relación con el primer y el segundo aspecto de la invención se aplican *mutatis mutandis* a este aspecto de la invención.

[0132] La utilidad del procedimiento de "formación de moldes" del primer y segundo aspecto de la invención no se limita a la formación de moldes a partir de ácidos nucleicos bicatenarios mediante una reacción de amplificación, aunque se prefiere esto. El procedimiento puede aplicarse a la linealización de polinucleótidos bicatenarios inmovilizados producidos sobre un soporte mediante cualquier otro medio.

5

Procedimientos de secuenciación

[0133] La invención también engloba un procedimiento de secuenciación de moldes de ácidos nucleicos generados usando los procedimientos de la invención. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento de
10 secuenciación de ácidos nucleicos que comprende formar un molde para la secuenciación de ácidos nucleicos usando un procedimiento según el primer o el segundo aspecto de la invención, y realizar una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos para determinar la secuencia en al menos una región del molde.

[0134] La secuenciación puede llevarse a cabo usando cualquier técnica de "secuenciación mediante síntesis"
15 adecuada, en la que los nucleótidos se añaden sucesivamente al grupo hidroxilo libre en 3', dando como resultado la síntesis de una cadena de polinucleótidos en dirección 5' a 3'. La naturaleza del nucleótido añadido se determina preferiblemente antes de cada adición.

[0135] Un punto de inicio para una reacción de secuenciación puede ser proporcionado por el apareamiento de un
20 cebador de secuenciación a una región monocatenaria del molde. Por lo tanto, la invención engloba procedimientos en los que la reacción de secuenciación de ácidos nucleicos comprende hibridar un cebador de secuenciación con una región monocatenaria del molde generado en la etapa (iii) del procedimiento o de "generación del molde" del primer o el segundo aspecto de la invención, incorporar secuencialmente uno o más nucleótidos en una hebra de polinucleótidos complementaria a la región del molde que se va secuenciar, identificar la base presente en uno o
25 más del (los) nucleótido(s) incorporado(s), y determinar así la secuencia de una región del molde.

[0136] En otras formas de realización de la invención, el punto de inicio para la reacción de secuenciación puede ser un grupo hidroxilo libre en 3' generado por la escisión de una hebra del propio molde (por ejemplo, mediante la
30 escisión de un nucleótido abásico con endonucleasa, calor o un álcali). Por lo tanto, la invención también proporciona procedimientos de secuenciación que implican la formación de un molde para la secuenciación de ácidos nucleicos usando un procedimiento que comprende las etapas (i) y (ii) únicamente de los procedimientos de "formación de moldes" del primer o el segundo aspecto de la invención, llevando a cabo una reacción de secuenciación por desplazamiento de hebra añadiendo secuencialmente uno o más nucleótidos al grupo hidroxilo libre en 3' generado en la hebra escindida en la etapa (ii), identificar la base presente en uno o más del (los) nucleótido(s) incorporado(s),
35 y determinar así la secuencia de una región del molde.

[0137] Un procedimiento de secuenciación preferido que puede usarse en todos los aspectos de la invención se basa en el uso de nucleótidos modificados que contienen grupos bloqueantes de 3' que pueden actuar como
40 terminadores de la cadena. Una vez que el nucleótido modificado se ha incorporado en la cadena de polinucleótidos en crecimiento complementaria a la región del molde que se quiere secuenciar, ya no hay ningún grupo 3'-OH libre disponible para dirigir adicionalmente la extensión de la secuencia, y por lo tanto la polimerasa no puede añadir nucleótidos adicionales. Una vez que se ha determinado la naturaleza de la base incorporada en la cadena en crecimiento, puede eliminarse el bloqueo en 3' para permitir la adición del siguiente nucleótido sucesivo. Al ordenar los productos derivados usando estos nucleótidos modificados, es posible deducir la secuencia de ADN del molde
45 de ADN. Dichas reacciones pueden realizarse en un único experimento y cada uno de los nucleótidos modificados tiene unido un marcador distinto, conocido por corresponder a la base en particular, para facilitar la discriminación entre las bases añadidas en cada etapa de incorporación. Alternativamente, puede llevarse a cabo una reacción por separado que contenga cada uno de los nucleótidos modificados por separado.

[0138] Los nucleótidos modificados pueden portar un marcador para facilitar su detección. Preferiblemente, éste es un marcador fluorescente. Cada tipo de nucleótido puede portar un marcador fluorescente diferente. Sin embargo, el
50 marcador detectable no tiene que ser un marcador fluorescente. Puede usarse cualquier marcador que permita la detección de un nucleótido incorporado.

[0139] Un procedimiento para detectar los nucleótidos con marcadores fluorescentes comprende usar luz láser con una longitud de onda específica para los nucleótidos marcados, o el uso de otras fuentes de iluminación adecuadas. La fluorescencia del marcador del nucleótido puede ser detectada por una cámara CCD o por otro medio de
55 detección adecuado.

[0140] Los procedimientos de la invención no se limitan al uso del procedimiento de secuenciación detallado anteriormente, sino que pueden usarse junto con esencialmente cualquier metodología de secuenciación que se base en la incorporación sucesiva de nucleótidos en una cadena de polinucleótidos. Algunas técnicas adecuadas incluyen, por ejemplo, Pyrosequencing™, FISSEQ (secuenciación fluorescente *in situ*), MPSS (secuenciación
60 masiva de firmas en paralelo) y secuenciación mediante procedimientos basados en ligación.

65

[0141] El polinucleótido objetivo que se va a secuenciar usando el procedimiento de la invención puede ser cualquier polinucleótido que se desee secuenciar. El polinucleótido objetivo puede ser de secuencia conocida, desconocida o parcialmente conocida, por ejemplo, en aplicaciones de resecuenciación. Usando el procedimiento de preparación de moldes descrito con detalle en este documento es posible preparar moldes partiendo esencialmente de cualquier polinucleótido objetivo bicatenario de secuencia conocida, desconocida o parcialmente conocida. Con el uso de matrices es posible secuenciar múltiples objetivos con la misma o con diferente secuencia, en paralelo. Una aplicación particularmente preferida del procedimiento es la secuenciación de fragmentos de ADN genómico.

[0142] La invención se comprenderá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes.

Antecedentes

[0143] El uso de un diol en ADN o en oligonucleótidos se ha registrado ampliamente en la bibliografía como un conector escindible o una funcionalidad aldehído enmascarada, y se ha usado para diversas aplicaciones como mutagénesis (Karion y col. (2001) Nucl. Acids Res. 29 (12), 2456 - 2463), estudio de mecanismos enzimáticos (Brevnov M. G. y col. (1997) Nucl. Acids Res. 25 (16), 3302 - 3309), modificaciones postsintéticas de oligonucleótidos (Ollivier N. y col. (2002) Tet. Lett. 43, 997 - 999) o nuevos soportes sólidos para la síntesis automatizada de péptidos (Melnik O. y col. (2001) J. Org. Chem. 66 (12), 4153 - 4160). Se ha demostrado que el procedimiento de desprotección es compatible con la integridad del ADN.

Procedimientos generales

[0144] Los siguientes son procedimientos generales usados en los ejemplos anexos.

Recubrimiento con acrilamida de chips de vidrio

[0145] Los soportes sólidos usados en este experimento fueron chips de vidrio de 8 canales tales como los proporcionados por Micronit (Twente, Holanda) o IMT (Neuchâtel, Suiza). Sin embargo, las condiciones experimentales y los procedimientos son fácilmente aplicables a otros soportes sólidos.

[0146] Los chips se lavaron como sigue: Decon puro durante 30 min, H₂O milliQ durante 30 min, NaOH 1 N durante 15 min, H₂O milliQ durante 30 min, HCl 0,1 N durante 15 min, H₂O milliQ durante 30 min.

Preparación de la disolución de polímero

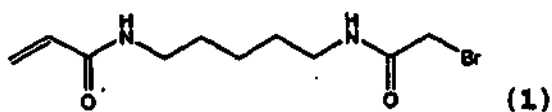
[0147] Para 10 ml de una mezcla de polimerización al 2%.

- 10 ml de una disolución al 2% de acrilamida en H₂O milliQ
- 165 µl de una disolución de 100 mg/ml de N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA) en DMF (23,5 mg en 235 µl de DMF)
- 11,5 µl de TEMED
- 100 µl de una disolución de 50 mg/ml de persulfato potásico en H₂O milliQ (20 mg en 400 µl de H₂O)

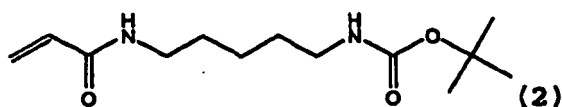
[0148] En primer lugar se desgasificó la disolución de 10 ml de acrilamida con argón durante 15 min. Sucesivamente se añadieron las disoluciones de BRAPA, TEMED y persulfato potásico a la disolución de acrilamida. Después la mezcla se sometió rápidamente a una agitación vorticial y se usó inmediatamente. Entonces se llevó a cabo la polimerización durante 1 h 30 a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los canales con H₂O milliQ durante 30 min. Entonces el portaobjetos se secó inyectando argón a través de las entradas y se almacenó a baja presión en un desecador.

Síntesis de N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA)

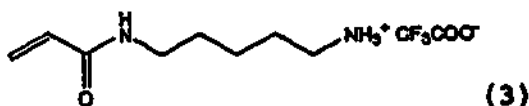
[0149]



[0150] Se obtuvo ácido N-Boc-1,5-diaminopentanotoluensulfónico en Novabiochem. El cloruro de bromoacetilo y el cloruro de acrililo se obtuvieron en Fluka. Todos los demás reactivos eran productos de Aldrich.



[0151] A una suspensión agitada de ácido *N*-Boc-1,5-diaminopentanotoluensulfónico (5,2 g, 13,88 mmol) y trietilamina (4,83 ml, 2,5 eq) en THF (120 ml) a 0°C se añadió cloruro de acrilóilo (1,13 ml, 1 eq) a través de un embudo de goteo con presión igualada durante un periodo de una hora. Entonces la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se comprobó el progreso de la reacción mediante TLC (éter de petróleo : acetato de etilo 1:1). Después de dos horas, las sales formadas durante la reacción se filtraron y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (éter de petróleo puro seguido por un gradiente de acetato de etilo de hasta el 60%) para rendir 2,56 g (9,98 mmol, 71%) del producto 2 como un sólido beis. RMN-¹H (400 MHz, d₆-DMSO) : 1,20 - 1,22 (m, 2H, CH₂), 1,29 - 1,43 (m, 13H, tBu, 2 x CH₂), 2,86 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz y 12,9 Hz, CH₂), 3,07 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz y 12,9 Hz, CH₂), 5,53 (dd, 1H, *J* = 2,3 Hz y 10,1 Hz, CH), 6,05 (dd, 1H, *J* = 2,3 Hz y 17,2 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, *J* = 10,1 Hz y 17,2 Hz, CH), 6,77 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz, NH), 8,04 (bs, 1H, NH). Masa (electrospray+) calculada para C₁₃H₂₄N₂O₃ 256, encontrada 279 (256+Na⁺).



[0152] Se disolvió el producto 2 (2,56 g, 10 mmol) en ácido trifluoroacético:diclorometano (1:9, 100 ml) y se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó mediante TLC (diclorometano:metanol 9:1). Al completarse, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se coevaporó tres veces con tolueno y después se purificó mediante cromatografía flash (diclorometano puro seguido por un gradiente de metanol de hasta el 20%). El producto 3 se obtuvo como un polvo blanco (2,43 g, 9 mmol, 90%). RMN-¹H (400 MHz, D₂O) : 1,29 - 1,40 (m, 2H, CH₂), 1,52 (quint., 2H, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 1,61 (quint., 2H, *J* = 7,7 Hz, CH₂), 2,92 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, CH₂), 3,21 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, CH₂), 5,68 (dd, 1H, *J* = 1,5 Hz y 10,1 Hz, CH), 6,10 (dd, 1H, *J* = 1,5 Hz y 17,2 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, *J* = 10,1 Hz y 17,2 Hz, CH). Masa (electrospray+) calculada para C₈H₁₆N₂O 156, encontrada 179 (156+Na⁺).

[0153] A una suspensión de producto 3 (6,12 g, 22,64 mmol) y trietilamina (6,94 ml, 2,2 eq) en THF (120 ml) se añadió cloruro de bromoacetilo (2,07 ml, 1,1 eq), a través de un embudo de goteo con presión igualada durante un periodo de una hora y a -60°C (baño de hielo seco e isopropanol en un vaso dewar). Entonces la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta el día siguiente, y la compleción de la reacción fue comprobada mediante TLC (diclorometano:metanol 9:1) el día siguiente. Las sales formadas durante la reacción se filtraron y la mezcla de reacción se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía (diclorometano puro seguido por un gradiente de metanol de hasta el 5%). Se obtuvieron 3,2 g (11,55 mmol, 51%) del producto 1 (BRAPA) como un polvo blanco. Una recristalización adicional de realizada en éter de petróleo : acetato de etilo dio 3 g del producto 1. RMN-¹H (400 MHz, d₆-DMSO) : 1,21 - 1,30 (m, 2H, CH₂), 1,34 - 1,48 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,02 - 3,12 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,81 (s, 2H, CH₂), 5,56 (d, 1H, *J* = 9,85 Hz, CH), 6,07 (d, 1H, *J* = 16,9 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, *J* = 10,1 Hz y 16,9 Hz, CH), 8,07 (bs, 1H, NH), 8,27 (bs, 1H, NH). Masa (electrospray+) calculada para C₁₀H₁₇BrN₂O₂ 276 ó 278, encontrada 279 (278+H⁺), 299 (276+Na⁺).

Injerto de cebadores

[0154] Los cebadores eran oligonucleótidos de 5'-fosforotioato. Sus secuencias y sus proveedores variaban según el experimento para el que se usaban (véanse los ejemplos específicos).

[0155] El injerto se llevó a cabo usando 80 μl por canal en tampón de fosfato 10 mM a pH 7 durante 1 h a temperatura ambiente.

Formación de colonias

[0156] Puede hibridarse un molde de PCR con los cebadores injertados inmediatamente antes de la reacción de PCR. La reacción de PCR comienza por tanto con una etapa inicial de extensión del cebador en lugar de la desnaturalización del molde.

[0157] El procedimiento de hibridación comienza con una etapa de calentamiento en un tampón riguroso (95°C durante 5 minutos en TE) para asegurar una desnaturalización completa antes de la hibridación del molde de PCR. Entonces se lleva a cabo la hibridación en 5 x SSC, usando el molde diluido a la concentración final deseada. Tras la hibridación, el chip se lavó durante cinco minutos con agua milliQ para eliminar las sales.

[0158] Se llevó a cabo una amplificación de superficie mediante PCR termociclada en un termociclador de MJ Research.

[0159] Un programa típico de PCR es como sigue:

- 5
- 1- 97,5°C durante 0:45
 - 2- X°C durante 1:30
 - 3- 73°C durante 1:30
 - 4- Ir a 1 [40] veces
 - 10 5- 73°C durante 5:00
 - 6- 20°C durante 3:00
 - 7- Fin

[0160] Dado que la primera etapa de la reacción de amplificación era la extensión de los cebadores unidos al molde en la etapa inicial de hibridación, se omiten las primeras etapas de desnaturalización y de apareamiento de este programa (es decir, el chip se pone en el bloque de calentamiento únicamente cuando la mezcla de PCR es bombeada a través de la celda de flujo y la temperatura es de 73°C).

[0161] La temperatura de hibridación (X°C, etapa 2) depende del par de cebadores que se use. Algunos experimentos han determinado una temperatura óptima de hibridación de 57°C para cebadores P5 / P7. Para otros pares de cebadores, la temperatura óptima de hibridación puede determinarse experimentalmente. El número de ciclos de PCR puede variarse si se requiere.

[0162] La PCR se llevó a cabo en una disolución de reacción que comprende 1 x tampón de reacción de PCR (suministrado con la enzima) betaína 1 M, DMSO al 1,3%, dNTPs 200 µM y 0,025 U/µL de polimerasa Taq.

[0163] Las características generales del procedimiento de amplificación en fase sólida para producir colonias de ácidos nucleicos son según se describe en las solicitudes internacionales de patente WO 98/44151 y WO 00/18957.

30 Linealización

[0164] Véanse los procedimientos descritos en los ejemplos específicos.

Deshibridación térmica

[0165] La desnaturalización térmica o deshibridación de colonias linealizadas se llevó a cabo en tampón riguroso (TE). La temperatura se elevó 0,5°C/s hasta 97,5°C y se mantuvo a 97,5°C durante 2 minutos 30 segundos.

Hibridación del cebador de secuenciación

[0166] El procedimiento comienza con una etapa de calentamiento en un tampón riguroso (TE) para asegurar la completa desnaturalización de las colonias antes de la hibridación con el cebador.

[0167] La hibridación se llevó a cabo en 5 x SSC, usando un oligonucleótido diluido hasta una concentración final de 500 nM. Esta disolución debería prepararse justo antes de su uso, especialmente cuando se usan oligonucleótidos marcados con fluoróforo.

[0168] La temperatura típica del perfil de ciclado era como sigue:

- 50 Ajuste del programa del termociclador de MJ-Research:
(procedimiento de control: bloque)
- 1- 0,5°C/s a 97,5°C
 - 2- 97,5°C durante 2:30
 - 3- 97,5°C durante 0:02
 - 55 -0,1°C por ciclo
 - 4- IR a 3 durante 574 veces
 - 5- 40°C durante 15:00
 - 6- Fin

60 **Ejemplo 1 - evaluación de la escisión del cebador de diol en el chip de 8 canales (Baccarat)**

[0169] Oligonucleótidos usados:

Oligonucleótido P5 complementario marcado (suministrado por Eurogentec):

65

5'-Rojo de Texas -TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'-OH (ID. SEC. N°: 1)

Cebador de control del injerto (suministrado por Eurogentec):

5 5'-fosforotioato-GTAGACTGCATGACCTGTAG-3'-Cy3 (ID. SEC. N°: 2)

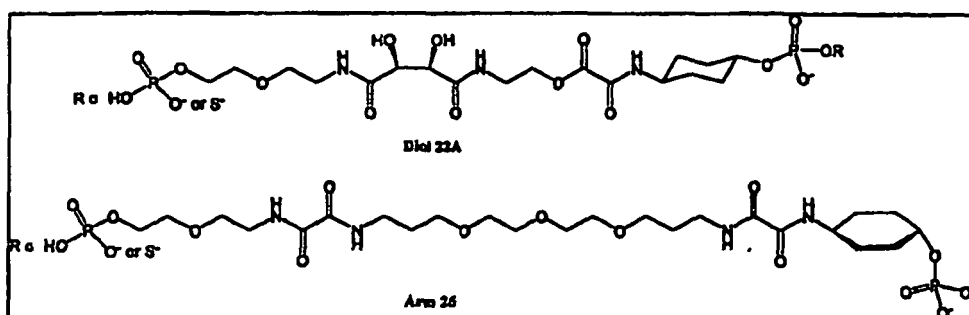
Cebador P5 no escindible (suministrado por Eurogentec):

10 5'-fosforotioato-TTTTTTTTTTAATGATACGGCGACCACCGA-3'OH (ID. SEC. N°: 3)

Cebador P5 escindible (suministrado por Fidelity systems):

15 5'-fosforotioato-brazo 26-diol 22A-AATGATACGGCGACCACCGA-3'OH (ID. SEC. N°: 4)

15 [0170] Las estructuras de los componentes del brazo 26 y el diol 22A eran como sigue:



20 [0171] El injerto se realizó según el procedimiento descrito en los procedimientos generales. Se injertaron los canales 1 y 2 de un chip de 8 canales usando el cebador no escindible, los canales 5, 6 y 7 canales usando el conector de diol escindible, y el canal 8 usando el control del injerto.

25 [0172] Se realizó una primera hibridación usando el oligonucleótido P5 complementario (ID. SEC. N°: 1) para medir el porcentaje de oligonucleótidos P5 unidos a la superficie. Las condiciones de hibridación estándar se describen anteriormente en los procedimientos generales. Los canales a escindir se trataron con una disolución de peryodato sódico 0,1 M en agua durante 30 min a temperatura ambiente, manteniéndose el canal 1 como control para evaluar el potencial daño al ADN o a la superficie por el peryodato sódico. Entonces los canales se lavaron durante 5 minutos con agua milliQ y después 5 min con tampón 5 X SSC a temperatura ambiente.

30 [0173] Se llevó a cabo una segunda hibridación usando el oligonucleótido P5 complementario (ID. SEC. N°: 1) para evaluar el porcentaje de oligonucleótidos no escindidos. Entonces se realizó un segundo tratamiento con peryodato sódico 0,1 M durante 15 min seguido de las mismas condiciones de lavado, y una última hibridación usando el oligonucleótido P5 complementario. Después de cada hibridación se escaneó el chip usando los siguientes ajustes: plano focal +3 mm, 600 V, 610 PB / Rojo (633 nm). Entonces se normalizaron las intensidades.

35 Resultados

40 [0174] Los resultados ilustrados gráficamente en la Figura 4 muestran que el conector de diol (ID. SEC. N°: 4) fue escindido con una eficacia del 70%.

40 **Ejemplo 2 - formación de colonias de ácidos nucleicos en chips de 8 canales (Baccarat) recubiertos con acrilamida (SFA) usando un cebador de diol**

45 [0175] Oligonucleótidos usados:

Cebador P5 no escindible (suministrado por Eurogentec):

5'-fosforotioato-TTTTTTTTTTAATGATACCAGCGACCACCGA -3'OH (ID. SEC. N°: 3)

50 Cebador P7 no escindible (suministrado por Eurogentec):

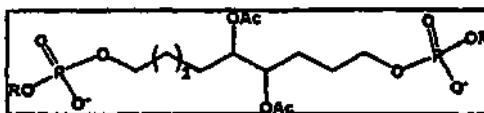
5'-fosforotioato- TTTTTTTTTTCAAGCAGAAGACGGCATACGA -3'OH (ID. SEC. N°: 5)

Cebador P5 escindible (suministrado por ATD):

5'-fosforotioato-TTTTTTTTTT-(diol) X3-AATGATACGGCGACCACCGA -3'OH (equivalente a la ID. SEC. N°: 3 pero incluyendo el conector de diol)

5

[0176] La estructura del conector de "diol" incorporado en el cebador escindible era como sigue:



10 [0177] Se apreciará que la unidad conectora es incorporada con el diol en una forma OAc protegida durante la síntesis de oligonucleótidos. El diol libre es liberado mediante el tratamiento con amoníaco durante la escisión/desprotección de los oligonucleótidos. Por lo tanto, los cebadores usados en la reacción de injerto contienen el diol libre.

15 [0178] El injerto se realizó según el procedimiento descrito en los procedimientos generales. Se injertaron los canales 1, 2 y 3 de un chip de 8 canales usando el par de cebadores no escindibles P5 / P7 (ID. SEC. N° 3 y 5), los canales 4, 5, 6, 7 y 8 usando el cebador de diol P5 escindible ilustrado anteriormente (equivalente a la ID. SEC. N°: 3 pero incluyendo el conector de diol entre la porción de poliT y la porción de P5) con el cebador no escindible P7 (ID. SEC. N°: 5).

20 [0179] El molde usado para la amplificación fue una genoteca de fragmentos de PCR derivada de PhiX 174. Los fragmentos contenían secuencias "terminales" comunes que permitían la amplificación con los cebadores P5 y P7 que flanquean los fragmentos de 400 - 700 pb de PhiX 174 de secuencia desconocida. La hibridación del molde se lleva a cabo sustancialmente según se describe anteriormente en los procedimientos generales, usando una disolución 100 pM de molde para los canales 2, 3, 4, 5, 6 y 7, manteniéndose los canales 1 y 8 únicamente como controles del
25 cebador. La PCR se realizó según se describe en los procedimientos generales. Los productos de la amplificación se tiñeron entonces con SyBr Verde-I en tampón TE (1/10.000), usando 100 µl por canal y se visualizaron usando un objetivo de 0,4, un Filtro Xf 22 y con un tiempo de adquisición de 1 segundo (ganancia 1).

Resultados

30

[0180] Las Figuras 5 y 6 ilustran que se obtuvo con éxito la formación de colonias usando el cebador escindible de diol.

35 **Ejemplo 3 - escisión y subsiguiente hibridación de las colonias de ácidos nucleicos generadas en un cebador escindible de diol**

[0181] Oligonucleótido usado:

Cebador de secuenciación A594 (suministrado por Eurogentec):

40

5'-A594- CTGGCACGACAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTG -3'-OH (ID. SEC. N°: 6)

45 [0182] Los canales a escindir se trataron con una disolución de peryodato sódico 0,1 M y etanolamina 0,1 M en agua durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los demás canales se lavaron con agua milliQ. Entonces todo los canales se lavaron durante 30 minutos con agua milliQ a temperatura ambiente.

50 [0183] La hibridación se llevó a cabo usando el cebador de secuenciación (ID. SEC. N°: 6) marcado con A594 para evaluar el porcentaje de oligonucleótidos no escindidos. El cebador de secuenciación se hibridó con los agregados linealizados preparados según se describió anteriormente a 500 nM, usando unas condiciones de hibridación estándar según se describe en los procedimientos generales. Entonces se tomó una imagen del chip usando un filtro naranja con un tiempo de exposición de 1 s.

Resultados

55 [0184] Como se esperaba, los canales injertados con los cebadores no escindibles (canales 2 y 3) tratados o no tratados con peryodato sódico, no dieron ninguna señal de hibridación con el cebador de secuenciación. Como las colonias de estos canales todavía son bicatenarias, no puede producirse hibridación del cebador de secuenciación.

60 [0185] No se observó señal para el cebador escindible tratado con agua milliQ (sin peryodato sódico).

[0186] La hibridación de cebador de secuenciación se detectó en los dos canales de diol tratados con peryodato sódico.

Ejemplo 4: recubrimiento con acrilamida de celdas de flujo Silex

5

[0187] Los soportes sólidos usados fueron típicamente celdas de flujo de vidrio de 8 canales tales como las proporcionadas por Silex Microsystems (Suecia). Sin embargo, las condiciones y los procedimientos experimentales son fácilmente aplicables a otros soportes sólidos.

10 **[0188]** En la Figura 7 se muestra una representación esquemática de una de dichas celdas de flujo. La celda de flujo está formada en tres capas. La capa inferior 1 está formada por borosilicato de vidrio a una profundidad de 1.000 μm . En la parte superior se coloca una capa de silicio grabado (100 μm de profundidad) para definir 8 canales de reacción individuales. La capa superior 3 (300 μm de profundidad) incluye dos series individuales de 8 agujeros 4 y 4' ajustados con los canales de la capa de canales de silicio grabados, con objeto de proporcionar una comunicación
15 fluida con el contenido de los canales cuando se ensambla la celda de flujo durante su uso.

[0189] Las celdas de flujo se lavaron como sigue: Decon puro durante 30 min, H₂O milliQ durante 30 min, NaOH 1 N durante 15 min, H₂O milliQ durante 30 min, HCl 0,1 N durante 15 min, H₂O milliQ durante 30 min.

20 Preparación de la disolución de polímero

[0190] Para 10 ml de una mezcla de polimerización al 2%.

- 10 ml de una disolución al 2% de acrilamida en H₂O milliQ
25 - 165 μl de una disolución de 100 mg/ml de N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA) en DMF (23,5 mg en 235 μl de DMF)
- 11,5 μl de TEMED
- 100 μl de una disolución de 50 mg/ml de persulfato potásico en H₂O milliQ (20 mg en 400 μl de H₂O)

30 **[0191]** En primer lugar se desgasificó la disolución de 10 ml de acrilamida con argón durante 15 min. Se añadieron sucesivamente las disoluciones de BRAPA, TEMED y persulfato potásico a la disolución de acrilamida. Entonces la mezcla se sometió rápidamente a una agitación vorticial e inmediatamente se bombeó a la celda de flujo. Entonces se lleva a cabo la polimerización durante 1 h 30 a temperatura ambiente. A continuación, los canales se lavaron con H₂O milliQ durante 30 min y se llenaron con tampón de fosfato potásico 0,1 M para su almacenamiento hasta su
35 utilización.

Ejemplo 5: injerto de cebadores sobre la superficie de celdas de flujo Silex recubiertas con acrilamida

[0192] Se colocó una celda de flujo recubierta con acrilamida (SFA) en un termociclador de MJ-Research
40 modificado y se unió a una bomba peristáltica. La mezcla de injerto, que consistía en 0,5 μM de un cebador directo y 0,5 μM de un cebador inverso en tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0), se bombeó en los canales de la celda de flujo a una tasa de flujo de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 75 s a 20°C. Entonces se calentó el termociclador hasta 51,6°C, y la celda de flujo se incubó a esta temperatura durante 1 hora. Durante este tiempo, la mezcla de injerto experimento 18 ciclos de bombeo: la mezcla de injerto se bombeó a 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 20 s, después la disolución se bombeó hacia detrás y
45 hacia delante (5 s hacia delante a 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante, después 5 s hacia detrás a 15 $\mu\text{l}/\text{min}$) durante 180 s. Después de 18 ciclos de bombeo, la celda de flujo se lavó mediante bombeo con 5 x SSC / EDTA 5 mM a 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 300 s a 51,6°C. Entonces se enfrió el termociclador a 20°C.

[0193] Los cebadores serán típicamente oligonucleótidos de 5'-fosforotioato que incorporan cualquier secuencia o
50 modificación específica necesaria para la escisión. Sus secuencias y los proveedores variarán según el experimento en el que se vayan a usar, y en este caso eran complementarios de los extremos 5' del dúplex de molde. Para el experimento descrito, los agregados amplificados contenían un conector de diol en uno de los cebadores injertados. Los conectores de diol pueden introducirse incluyendo un conector adecuado en uno de los cebadores usados para la amplificación en fase sólida.

55

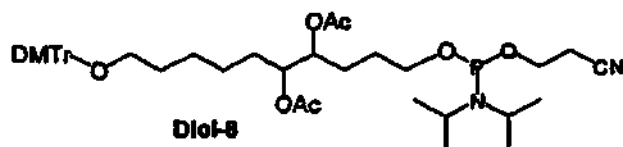
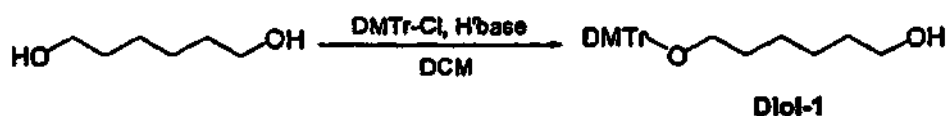
[0194] Los cebadores injertados contenían una secuencia de bases de T en el extremo 5' para que actuara como grupo separador para ayudar a la linealización y la hibridación. La síntesis del fosforamidito de diol se detalla a continuación. Los oligonucleótidos se preparan en un sintetizador de ADN comercial usando el fosforamidito de diol usando unas condiciones de acoplamiento estándar. La etapa final de escisión/desprotección en amoníaco escinde
60 los grupos acetato de la fracción de diol protegida, de forma que el oligonucleótido en disolución contiene la modificación del diol. Las secuencias de los dos cebadores injertados en la celda de flujo son:

5'-PS-TTTTTTTTTT-Diol-AATGATACGGCGACCACCGA-3' (equivalente a la ID. SEC. N°: 3 pero incluyendo el conector de diol) y

5'-PS-TTTTTTTTTTCAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (ID. SEC. N°: 5)

Ejemplo 6: preparación de diol-fosforamidito para el acoplamiento de ADN

5

**[0196] Etapa 1:**

10

[0197] Se disolvió 1,6-hexanodiol (Sigma Aldrich 99%) (14,6 g, 124 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hünig; Sigma Aldrich; redistilada) (21,6 ml, 124 mmol) en DCM / DMF anhidro (250 / 50 ml) bajo N₂. La disolución se enfrió hasta 0°C y se añadió la primera porción de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl; Sigma-Aldrich 95%) (10,5 g, 31 mmol). Entonces la mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente. Después de agitar durante 1 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C de nuevo y se añadió la segunda porción de DMTr-Cl (10,5 g, 31 mmol), y después se dejó agitando temperatura ambiente durante otras 2 horas. El análisis mediante TLC (EtOAc:éter de petróleo 4:6) indicó un consumo de aproximadamente el 95% del derivado del material inicial (DMTr-OH). La reacción se concentró a presión reducida y se vertió una disolución acuosa de NaHCO₃ (sat.) (500 ml) en el residuo. La mezcla resultante se extrajo con éter de petróleo / EtOAc (2:1) (3 x 1.000 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, y se concentraron a vacío. El residuo se and coevaporó con xileno (2 x 100 ml) para eliminar la DMF. La mezcla de reacción se preabsorbió en gel de sílice y se sometió a una cromatografía flash usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (7:3) como eluyente. El rendimiento del aceite amarillo claro fue de 16,58 g, 64%, con 7,8 g (17%) adicionales del subproducto bis-tritilado.

25

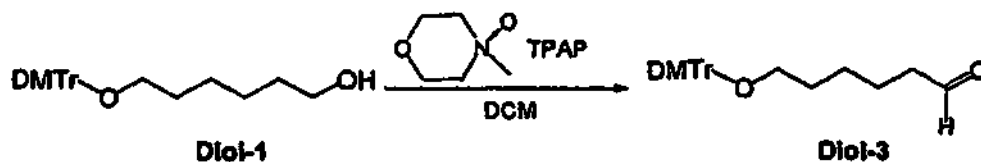
[0198] TLC: R_f: 0,35 (diol-1); R_f: 0,7 (subproducto bis-tritilado) (éter de petróleo / EtOAc 6:4).

[0199] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,32 - 1,44 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,54 - 1,68 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,06 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,62 - 3,68 (m, 2H, CH₂OH), 3,81 (s, 6H, 2 x MeO), 6,83 - 6,85 (m, 4H, Ph), 7,24 - 7,35 (m, 7H, Ph), 7,45 - 7,47 (m, 2H, Ph).

30

Etapa 2:**[0200]**

35



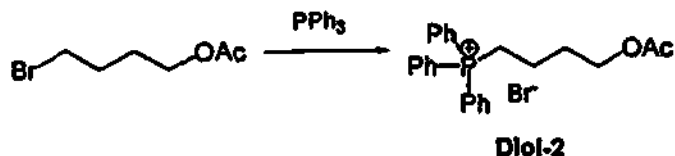
[0201] A una disolución del diol-1 (16,6 g, 39,5 mmol) en DCM anhidro (200 ml), se añadió perrutenato de tetrapropilamonio (TPAP; Sigma Aldrich 97%) (277 mg, 0,79 mmol) bajo una atmósfera de N₂. La disolución se enfrió hasta 0°C y se añadió *N*-óxido de *N*-metilmofolino (Sigma Aldrich 97%) (2,7 g, 23 mmol). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente. Después de 1 hora, se añadieron las otras tres porciones de *N*-óxido de *N*-metilmofolino (3 x 2,0 g, 51,2 mmol) durante un periodo de cuatro horas. La TLC (EtOAc:éter de petróleo 4:6) indicó que la reacción siguió hasta su finalización. La reacción se extinguió con NaHCO₃ (sat.) acuoso (1.000 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 1.000 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄. La disolución se concentró a presión reducida. El diol-3, 9,9 g, 60%, se aisló mediante cromatografía flash usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (6:4) como eluyente, como un aceite amarillo claro.

45

[0202] TLC: R_f: 0,7 (éter de petróleo / EtOAc 6:4).

[0203] RMN-¹H (400MHz, CDCl₃) : δ 1,30 - 1,37 (m, 2H, CH₂), 1,48 - 1,57 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,34 (td, *J* = 1,7 y 7,4 Hz, 2H, CH₂CHO), 2,97 (s, 2H, CH₂O), 3,72 (s, 6H, 2 x MeO), 6,73 - 6,76 (m, 4H, Ph), 7,10 - 7,26 (m, 7H, Ph), 7,34 - 7,36 (m, 2H, Ph), 9,67 (t, *J* = 1,7, 1H, CHO).

5 Etapa 3:



[0205] Se calentó una disolución de trifetilfosfina (Sigma-Aldrich 99%, ReagentPlus™) (39,3 g, 150 mmol) y acetato de 4-bromobutilo (Sigma-Aldrich) (26 ml, 180 mmol) en tolueno anhidro (300 ml) a reflujo durante 36 horas bajo N₂ en un baño de aceite (140°C). Durante el reflujo el aceite precipitó. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente. El análisis mediante TLC (éter de petróleo / EtOAc 7:3) de la disolución de tolueno demostró que todavía había trifetilfosfina (R_f: 0,8). El sobrenadante se decantó en otro matraz de fondo redondo y se concentró hasta un volumen aproximado de 30 ml. La disolución se calentó a reflujo de nuevo durante otras 12 horas. El sobrenadante se decantó. Las porciones de aceite se combinaron entre sí, se disolvieron en agua (500 ml) y se extrajeron con EtOAc (2 x 15 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se retroextrajeron con agua (150 ml). Se combinaron dos lotes de capas acuosas, se evaporaron a presión reducida. El residuo resultante se coevaporó con acetonitrilo (2 x 100 ml) para dar 78,4 g, 95% de rendimiento de un aceite amarillo claro. La RMN indica que el producto era puro, y se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

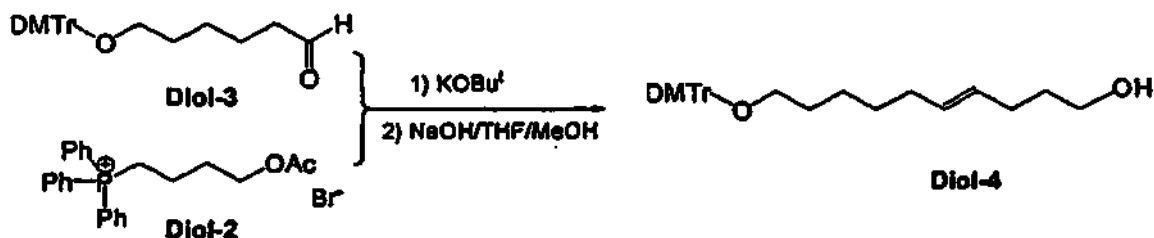
20 **[0206]** TLC: R_f: 0,0 (éter de petróleo / EtOAc 7:3).

[0207] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,63 - 1,73 (m, 2H, CH₂), 1,94 (s, 3H, 2 x CH₃), 2,06 - 2,16 (m, 2H, CH₂), 3,97 - 4,05 (m, 2H, CH₂P), 4,11 (t, *J* = 6,0, 2H, CH₂O), 7,69 - 7,95 (m, 15H, Ph).

25 **[0208]** RMN-³¹P (162 MHz, CDCl₃): 25,9 ppm.

[0209] Detalles del espectro de masas: CL-EM (Electrospray positivo): (M⁺) 377.

Etapa 4:



30

[0211] Se pesó el diol-2 (10,34 g, 22,7 mmol) en un matraz de fondo redondo y se disolvió con DCM (20 ml). La disolución se evaporó entonces a presión reducida hasta que dio una espuma blanca. Entonces el matraz se sometió a alto vacío durante 24 h. A este matraz se añadió THF anhidro (180 ml) bajo N₂. La suspensión resultante se 35 enfrió hasta -78°C con un baño de acetona-hielo seco. Con agitación vigorosa se añadió KOBu^t (3,3 g, 29,5 mmol) bajo N₂. Lentamente el color de la suspensión se volvió naranja, y gradualmente precipitaron sólidos blancos. A esta suspensión se añadió gota a gota una disolución del diol-3 (secado a 60°C a alto vacío durante 1 h antes de la reacción), (9,5 g, 22,7 mmol) en THF (50 ml) durante media hora. Entonces se retiró el baño de acetona-hielo seco. La mezcla de reacción se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó durante otra hora. El color de 40 la mezcla de reacción se volvió amarillo tras la adición del diol-3. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo resultante se particionó entre DCM (800 ml) y NaCl (sat.) acuoso (800 ml). La capa acuosa se extrajo con DCM adicional (2 x 800 ml). Las extracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar un aceite amarillo. El aceite se disolvió en THF/MeOH (125/100 ml) y se enfrió hasta 0°C. A esta disolución se añadió NaOH (1 M en H₂O, 25 ml). Después de dejar la reacción en 45 agitación durante 1 hora, el análisis mediante TLC indicó un consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético (1,5 ml). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo resultante se particionó entre DCM (800 ml) y NaHCO₃ (sat.) acuoso (800 ml). La capa acuosa se extrajo con DCM adicional (2 x 800 ml). Las extracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un aceite amarillo claro. El diol-4, 6,45 g, 60% se aisló mediante cromatografía flash usando disolventes que contenían un

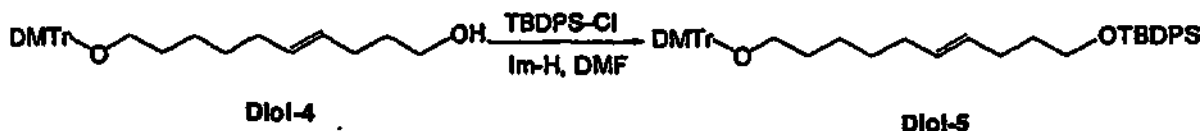
1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (5:5) como eluyente, como un aceite amarillo claro.

[0212] TLC: R_f = 0,45 (éter de petróleo / EtOAc 6:4).

5

[0213] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,24 - 1,32 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,54 - 1,57 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,93 - 1,96 (m, 2H, CH₂), 2,02 - 2,07 (m, 2H, CH₂), 2,96 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,54 - 3,59 (m, 2H, CH₂OH), 3,72 (s, 6H, 2 x MeO), 5,29 - 5,32 (m, 2H, 2 x =CH), 6,73 - 6,77 (m, 4H, Ph), 7,11 - 7,27 (m, 7H, Ph), 7,36 - 7,38 (m, 2H, Ph).

10 Etapa 5:

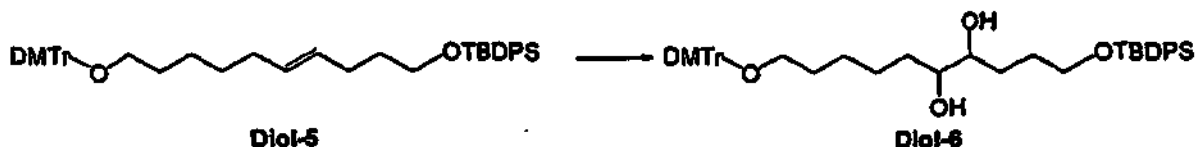


[0215] A una disolución del diol-4 (5,68 g, 12 mmol) e imidazol (Sigma Aldrich, 99%), (1,63 g, 24 mmol) en DMF anhidro (100 ml), se añadió gota a gota cloruro de *t*-butildifenilsililo (Sigma Aldrich, 98%), (4,05 ml, 15,6 mmol) bajo una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 1 hora. La TLC (éter de petróleo / EtOAc 8:2) indicó que el material de partida se había consumido completamente. Se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (500 ml) para extinguir la reacción. La mezcla resultante se extrajo con éter de petróleo / EtOAc (2:1) (3 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un aceite amarillo. El diol-5, 8,14 g, 95%, se aisló mediante cromatografía flash usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (9:1) como eluyente, como un aceite incoloro.

[0216] TLC: R_f = 0,7 (éter de petróleo : EtOAc 8:2).

[0217] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) : 8 0,97 (s, 9H, 3 x Me), 1,19 - 1,30 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,48 - 1,55 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,91 - 1,95 (m, 2H, CH₂), 2,01 - 2,06 (m, 2H, CH₂), 2,95 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,58 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 3,70 (s, 6H, 2 x MeO), 5,24 - 5,27 (m, 2H, 2 x =CH), 6,72 - 6,75 (m, 4H, Ph), 7,11 - 7,37 (m, 15H, Ph), 7,57 - 7,60 (m, 4H, Ph).

30 Etapa 6:

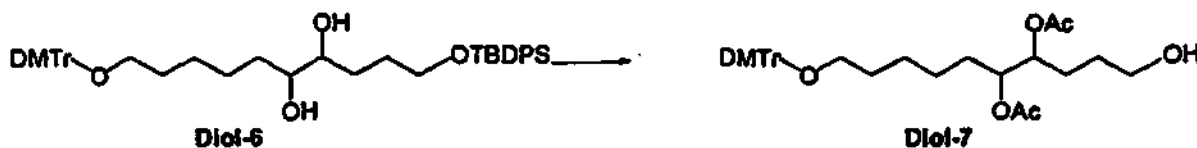


[0219] Se agitó conjuntamente vigorosamente una mezcla de diol-5 (9,27 g, 13 mmol), AD-mix-a (Sigma Aldrich), (18,2 g), metansulfonamida (Sigma Aldrich, 97%), (1,23 g, 13 mmol), *t*-BuOH (65 ml) y agua (65 ml) a 55°C durante 14 h. El análisis mediante TLC (éter de petróleo : EtOAc 6:4) indicó aproximadamente un consumo del 95% del material de partida. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se trató con sulfito sódico (15,3 g, 12 mmol), después se agitó adicionalmente durante 30 min. Se añadió a la reacción una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (500 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un aceite amarillo. El diol-6, 7,96 g, 82%, se aisló mediante cromatografía flash (gel de sílice, Fluka, malla de 70-230) usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (1:1) como eluyente, como un sólido blanco.

[0220] TLC: R_f = 0,3 (éter de petróleo : EtOAc 6:4).

[0221] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,07 (s, 9 H, 3 x Me), 1,41 - 1,7 (m, 12 H, 6 x CH₂), 1,94 (d, J = 4,3 Hz, 1H, OH), 2,94 - 2,95 (m, 1H, OH), 3,06 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,61 - 3,63 (m, 2 H, 2 x CHOH), 3,73 (t, J = 5,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,81 (s, 6H, 2 x MeO), 5,24 - 5,27 (m, 2H, 2 x =CH), 6,82 - 6,85 (m, 4H, Ph), 7,21 - 7,47 (m, 15 H, Ph), 7,57 - 7,60 (m, 4 H, Ph).

Etapa 7:

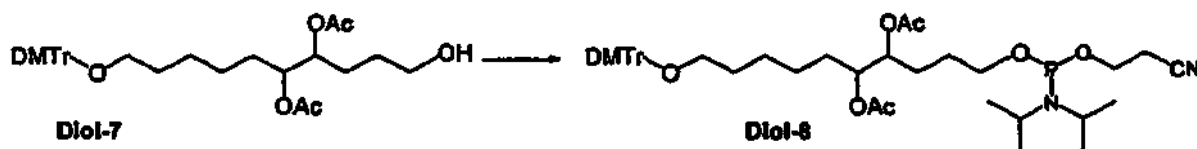


[0223] A una disolución del diol-6 (7,96 g, 13 mmol) y DMAP (Sigma-Aldrich ReagentPlus™, 99%) (260 mg, 2,13 mmol) en una mezcla de piridina (15 ml) y DCM (30 ml), se añadió anhídrido acético (Fluka 99%), (2,5 ml, 26,68 mmol) a temperatura ambiente. El análisis mediante TLC (éter de petróleo : EtOAc 6:4) indicó el consumo total del material de partida después de 1 h. La reacción se extinguió con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (500 ml). Después de 5 min, la mezcla se extrajo con DCM (3 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se coevaporó con tolueno (2 x 100 ml). El aceite amarillo resultante se sometió a un tapón de gel de sílice (50 g, Fluka, malla de 70 - 230) para eliminar la DMAP usando eluyentes que contienen un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (7:3) (250 ml de cada uno). Las fracciones combinadas de producto se concentraron a sequedad. El aceite incoloro resultante se disolvió en THF (100 ml) y se trató con TBAF (Sigma-Aldrich; 5% en agua), (1 M en THF, 15 ml) a 0°C. La disolución de reacción se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales. El análisis mediante TLC (éter de petróleo : EtOAc 6:4) indicó que la desililación se había completado. El disolvente volátil (THF) se evaporó a presión reducida a baja temperatura. Se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (500 ml) al residuo. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un aceite amarillo. El diol-7, 4,2 g, 66%, se aisló mediante cromatografía flash usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (1:1) como eluyente, como un sólido blanco.

[0224] TLC: R_f = 0,45 (éter de petróleo / EtOAc 1:1).

[0225] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 8 1,29 - 1,33 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,47 - 1,63 (m, 8 H, 4 x CH₂), 1,99, 2,01 (2s, 6H, 2 MeC (O)), 3,00 (t, J = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 3,60 - 3,64 (m, 2 H, CH₂O), 3,75 (s, 6H, 2 x MeO), 4,92 - 4,97 (m, 2H, 2 x CHOAc), 6,76 - 6,80 (m, 4H, Ph), 7,15 - 7,29 (m, 7 H, Ph), 7,38 - 7,40 (m, 2 H, Ph).

Etapa 8:



[0227] A una disolución del diol-7 (2,08 g, 3,5 mmol) y diisopropiletilamina (Sigma Aldrich), (1,53 ml, 8,75 mmol) en DCM (17 ml), se añadió gota a gota *N,N*-diisopropilclorofosforamidito de 2-cianoetilo (1,0 g, 4,2 mmol) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de agitar durante 1 hora, el análisis mediante TLC (éter de petróleo / EtOAc 4:6) indicó un consumo total del material de partida. El disolvente (THF) se concentró a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía directamente. El diol-8, 2,5 g, 90 %, se aisló mediante cromatografía flash usando disolventes que contenían un 1% de Et₃N desde éter de petróleo hasta éter de petróleo / EtOAc (1:1) como eluyente, como un jarabe incoloro.

[0228] TLC: R_f = 0,55 (éter de petróleo / EtOAc 4:6).

[0229] RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 8 1,09, 1,10, 1,11, 1,12 (4 s, 12 H, N(CHMe₂)₂), 1,26 - 1,31 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,45 - 1,56 (m, 8 H, 4 x CH₂), 1,95, 1,969, 1,971, 1,98 (4 s, 6H, 2 MeCO), 2,56 (t, J = 6,5 Hz, 2H, CH₂CN), 2,95 (t, J = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 3,49 - 3,55 (m, 4 H, CH₂O), 3,72 (s, 6H, 2 x MeO), 4,89 - 4,92 (m, 2H, 2 x CHOAc), 6,74 - 6,76 (m, 4H, Ph), 7,13 - 7,25 (m, 7 H, Ph), 7,34 - 7,37 (m, 2 H, Ph).

[0230] RMN-³¹P (162 MHz, CDCl₃): 148,67, 148,69 ppm.

Ejemplo 7: formación de colonias de ADN (agregados) sobre chips de Silix

Etapa 1: hibridación y amplificación

[0231] La secuencia de ADN usada en el proceso de amplificación era una secuencia única monomolde de 364 bases, con extremos complementarios a los cebadores injertados. La secuencia completa del dúplex de molde se muestra en la Figura 8 (ID. SEC. N°: 8). El dúplex de ADN (1 nM) se desnaturalizó usando un tratamiento con

ES 2 398 808 T3

hidróxido sódico 0,1 M seguido de una rápida dilución a la deseada "concentración de trabajo" de 0,2 - 2 pM en "tampón de hibridación" (5 x SSC / tween al 0,1%).

5 **[0232]** La amplificación de superficie se llevó a cabo mediante termociclado usando un termociclador MJ Research, acoplado a bombas peristálticas de 8 vías Ismatec IPC ISM931 equipadas con tuberías Ismatec (naranja / amarillo, de 0,51 mm de DI).

10 **[0233]** El molde monocatenario se hibridó con los cebadores injertados inmediatamente antes de la reacción de amplificación, que por lo tanto comienza con una etapa inicial de extensión del cebador más que con la desnaturalización del molde. El procedimiento de hibridación comienza con una etapa de calentamiento en tampón riguroso para asegurar la completa desnaturalización antes de la irritación. Después de la hibridación, que se produce durante una lenta etapa de enfriamiento de 20 min, la celda de flujo se lavó durante 5 minutos con un tampón de lavado (0,3 x SSC / tween al 0,1%).

15 **[0234]** En la siguiente tabla se detalla un proceso de amplificación típico, detallando los volúmenes de flujo por canal:

Etapa	Descripción	T (°C)	Tiempo (s)	Tasa de flujo (µl/min)	V bombeado (µl)
1	Bombeo de la premezcla de hibridación	20	120	60	120
2	Bombeo de la mezcla de hibridación	98,5	300	15	75
3	Eliminar las burbujas	98,5	10	100	16,7
4	Detener el flujo y mantener la T	98,5	30	Estática	0
5	Enfriamiento lento	98,5 - 40,2	19,5 min	Estática	0
6	Bombeo del tampón de lavado	40,2	300	15	75
7	Bombeo de la premezcla de hibridación	40,2	200	16	50
8	Bombeo de la mezcla de hibridación	40,2	75	60	75
9	Primera extensión	74	90	Estática	0
10 ciclos de amplificación de 1 a 30	Desnaturalización	98,5	45	Estática	0
	Rellenado de los canales	98,5	10	60	10
	Apareamiento	58	90	Estática	0
	Extensión	74	90	Estática	0
11	Mantener a 20°C	20	Infinito	Estática	0
12	Bombeo del tampón de lavado	74	300	15	75

Premezcla de hibridación (tampón) = 5 x SSC / tween al 0,1%

20

[0235] Mezcla de hibridación = muestra de hidróxido de ADN 0,1 M, diluido en premezcla de hibridación

Tampón de lavado = 0,3 x SSC / tween al 0,1%

25 **[0236]** Premezcla de amplificación = betaína 2 M, Tris 20 mM, sulfato amónico 10 mM, sulfato magnésico 2 mM, Triton al 0,1%, DMSO al 1,3%, pH 8,8.

[0237] Mezcla de amplificación = betaína 2 M, Tris 20 mM, sulfato amónico 10 mM, sulfato magnésico 2 mM, Triton al 0,1%, DMSO al 1,3%, pH 8,8 más mezcla de dNTP 200 µM y 25 unidades/ml de polimerasa Taq (Producto NEB ref. M0273L)

5 Etapa 2: linealización

[0238] Para linealizar los agregados de ácidos nucleicos formados dentro de los canales de las celdas de flujo, el componente informático de la instrumentación bombeó el apropiado tampón de linealización a través de la celda de flujo durante 20 minutos a temperatura ambiente a 15 µl/min (volumen total = 300 µl por canal), seguido por agua durante 5 minutos a temperatura ambiente.

[0239] El tampón de linealización consistía en 1.429 µl de agua, 64 mg de peryodato sódico, 1500 µl de formamida, 60 µl de Tris 1 M pH 8 y 11,4 µl de 3-aminopropanol, mezclado hasta un volumen final de 3 ml. En primer lugar se mezcló el peryodato con el agua mientras se mezclaba el Tris con la formamida. Las dos disoluciones se mezclaron entre sí y se añadió el 3-aminopropanol a la mezcla.

Etapa 3: bloqueo de los grupos 3'-OH extensibles

[0240] Para preparar la premezcla de bloqueo se mezclaron 1.360 µl de agua, 170 µl de tampón de bloqueo 10 X (tampón NEB 4; número de producto B7004S) y 170 µl de cloruro de cobalto (25 mM) hasta un volumen final de 1.700 µl. Para preparar la mezcla de bloqueo se mezclaron 1.065,13 µl de premezcla de bloqueo, 21,12 µl de mezcla de ddNTP 125 µM y 13,75 µl de transferasa terminal de TdT (NEB; parte nº M0252S) hasta un volumen final de 1.100 µl.

[0241] Para los ácidos nucleicos dentro de los agregados formados en los canales de las celdas de flujo, el componente informático de la instrumentación bombeó el apropiado tampón de bloqueo a través de la celda de flujo, y controló la temperatura según se muestra en las formas de realización ejemplares, a continuación.

Etapa	Descripción	T (°C)	Tiempo (s)	Tasa de flujo (µl/min)	V bombeado (µl)
1	Bombeo de la premezcla de bloqueo	20	-200	15	50
2	Bombeo de la mezcla de bloqueo	37,7	300	15	75
3	Detener el flujo y mantener la T	37,7	20	Estática	0
4	Bombeo cíclico de la mezcla de bombeo y esperar	37,7	8 x (20 + 180)	15 / estática	45
5	Bombeo del tampón de lavado	20	300	15	75

30 Etapa 4: desnaturalización de hibridación del cebador de secuenciación

[0242] Para preparar la mezcla de cebadores se mezclaron 895,5 µl de premezcla/tampón de hibridación y 4,5 µl de cebador de secuenciación (100 µM) hasta un volumen final de 900 µl. La secuencia del cebador de secuenciación usado en esta reacción era:

35

5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC-3' (ID. SEC. Nº: 7)

[0243] Para desnaturalizar los ácidos nucleicos de los agregados y para hibridar el cebador de secuenciación, el componente informático de la instrumentación bombeó las apropiadas disoluciones a través de la celda de flujo según se describe a continuación:

40

Etapa	Descripción	T (°C)	Tiempo (s)	Tasa de flujo (µl/min)	V bombeado (µl)
1	Bombeo de NaOH	20	300	15	75
2	Bombeo de TE	20	300	15	75
3	Bombeo de la mezcla de cebadores	20	300	15	75
4	Mantener a 60C	60	900	0	0
5	Bombeo del tampón de lavado	40,2	300	15	75

[0244] Después la desnaturalización y la hibridación del cebador de secuenciación, la celda de flujo estaba lista para la secuenciación.

5 **Ejemplo 8: ciclos de secuenciación del ADN**

[0245] La secuenciación se llevó a cabo usando nucleótidos modificados preparados según se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/018493, y se marcaron con cuatro fluoróforos disponibles comercialmente (Molecular Probes Inc.).

10

[0246] Se usó una enzima mutante de la polimerasa 9°N (una variante exo que incluye la triple mutación L408Y / Y409A / P410V, y C223S) para las etapas de incorporación de nucleótidos.

[0247] La mezcla de incorporación, el tampón de incorporación (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgSO₄ 6 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,05% (v/v), NaCl 50 mM) más YAV exo-C223S 110 nM y 1 μM de cada uno de los cuatro nucleótidos marcados modificados, se aplicó a los moldes agregados y se calentó a 45°C.

[0248] Los moldes se mantuvieron a 45°C durante 30 min, se enfriaron hasta 20°C y se lavaron con tampón de incorporación, después con 5 x SSC / Tween 20 al 0,05%. Entonces los moldes se expusieron a tampón de imagen (Tris 100 mM pH 7,0, NaCl 30 mM, Tween 20 al 0,05%, ascorbato sódico 50 mM, recién disueltos).

[0249] Los moldes se escanearon a 4 colores a temperatura ambiente.

[0250] Los moldes se expusieron entonces a ciclos de secuenciación de Escisión e Incorporación como sigue:

25

Escisión

[0251]

30 Cebiar con tampón de Escisión (Tris 0,1 M pH 7,4, NaCl 0,1 M y Tween 20 al 0,05%). Calentar hasta 60°C. Tratar los agregados con mezcla de Escisión (TCEP 100 mM en tampón de Escisión). Esperar un total de 15 min además de bombear tampón nuevo cada 4 min. Enfriar hasta 20°C.
Lavar con tampón Enzimológico.
35 Lavar con 5 x SSC / Tween 20 al 0,05%.
Cebiar con tampón de imagen.
Escanear a 4 colores a temperatura ambiente.

Incorporación

40

[0252]

Cebiar con tampón de Incorporación. Calentar hasta 60°C
Tratar con mezcla de Incorporación. Esperar un total de 15 min además de bombear mezcla de incorporación nueva cada 4 min.
45 Enfriar hasta 20°C.
Lavar con tampón de Incorporación.
Lavar con 5 x SSC / Tween 20 al 0,05%.
Cebiar con tampón de imagen.
50 Escanear a 4 colores a temperatura ambiente.

Repetir el proceso de Incorporación y Escisión durante tantos ciclos como sea necesario.

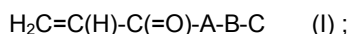
[0253] Los nucleótidos incorporados se detectan usando un aparato de imagen fluorescente de CCD basado en una reflexión interna total. Las imágenes se registraron y se analizaron para medir las intensidades y el número de objetos fluorescentes en la superficie. Las imágenes de dos mosaicos del primer ciclo de incorporación de nucleótidos para un canal linealizado y uno no linealizado (sin peryodato) se muestran en la Figura 9. Los puntos del histograma de estos mosaicos se muestran en la Figura 10. En el caso de la secuencia elegida para su amplificación, sólo se incorporó una única base (T) en cada agregado. Esta figura muestra claramente la presencia de agregados tanto en los canales linealizados como en los no linealizados, pero los agregados linealizados muestran una intensidad media de señal mucho mayor. En ausencia de la etapa de linealización, los agregados permanecen bicatenarios, y no pueden experimentar una hibridación eficaz con un cebador de secuenciación, y por lo tanto muestran una señal muy reducida tras el tratamiento con nucleótidos y polimerasa.

65 [0254] Las formas de realización preferidas se detallan en los siguientes párrafos:

Formas de realización**[0255]**

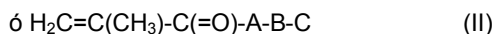
- 5 1. Un procedimiento para generar un molde para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende,
- 10 (i) proporcionar un hidrogel de poliacrilamida sobre soporte sólido con una o más moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios unidas al mismo, en el que ambas hebras de las moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios están unidas al hidrogel de poliacrilamida por el extremo 5',
- (ii) escindir una o ambas de las hebras de la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) bicatenario(s), y
- 15 (iii) someter la(s) hebra(s) escindida(s) a unas condiciones desnaturalizantes para eliminar la porción de la(s) hebra(s) escindida(s) que no está(n) unida(s) al hidrogel de poliacrilamida, generando así un molde parcialmente o sustancialmente monocatenario para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos.
2. Un procedimiento según el párrafo 1 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario es escindida en un sitio de escisión predeterminado.
- 20 3. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario es escindida en una o en ambas hebras a través de una reacción de escisión química.
4. Un procedimiento según el párrafo 3 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende un conector de diol y esta hebra es escindida mediante tratamiento con peryodato.
- 25 5. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario se trata para generar un sitio abásico y después escindir en el sitio abásico.
6. Un procedimiento según el párrafo 5 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una base de uracilo y el sitio abásico se genera mediante tratamiento con glucosilasa de uracilo.
- 30 7. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende uno o más ribonucleótidos, y la etapa (ii) comprende la escisión de esta hebra en un enlace fosfodiéster entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido.
- 35 8. Un procedimiento según el párrafo 7 en el que la etapa (ii) comprende la exposición a un ión metálico, preferiblemente, un ión de un metal lantánido.
9. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende uno o más nucleótidos metilados, y la etapa (ii) comprende la escisión de esta hebra usando una enzima específica para una secuencia de reconocimiento que incluya dicho(s) nucleótido(s) metilado(s).
- 40 10. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que la etapa (ii) comprende la escisión de una o de ambas hebras del ácido nucleico bicatenario mediante un mecanismo fotoquímico.
- 45 11. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que la etapa (ii) comprende la escisión de una o de ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario con una enzima que no es una endonucleasa de restricción ni una endonucleasa de corte.
- 50 12. Un procedimiento según el párrafo 11 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende dos o más ribonucleótidos consecutivos, y la etapa (ii) comprende la escisión con una ribonucleasa.
13. Un procedimiento según el párrafo 12 en el que la ribonucleasa es ARNasaA.
- 55 14. Un procedimiento según el párrafo 1 o el párrafo 2 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene un péptido unido covalentemente en el extremo 5', y la etapa (ii) comprende la escisión del péptido.
- 60 15. Un procedimiento según uno cualquiera de los párrafos precedentes en el que el hidrogel de poliacrilamida está sustancialmente exento de ligante de silano.
16. Un procedimiento según uno cualquiera de los párrafos precedentes en el que el hidrogel sobre soporte sólido se prepara mediante un procedimiento que comprende la polimerización sobre un soporte sólido de una mezcla de:
- 65

- (i) un primer comonomero que es acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo o N-vinil pirrolidiona; y
(ii) un segundo comonomero que es una acrilamida funcionalizada o un acrilato de fórmula (I):



5

ó un metacrilato o una metacrilamida de fórmula (II):



10

(en las que:

A es NR u O, en la que R es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo saturado opcionalmente sustituido que comprende entre 1 y 5 átomos de carbono;

15

-B- es un birradical alquileo opcionalmente sustituido de fórmula $-(\text{CH}_2)_n-$ en la que n es un número entero entre 1 y 50; y en la que n = 2 o más, uno o más birradicales etileno opcionalmente sustituidos $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ de dicho birradical alquileo pueden sustituirse independientemente por fracciones de etenileno y etinileno; y en la que n = 1 o más, uno o más birradicales metileno $-\text{CH}_2-$ pueden sustituirse independientemente por un birradical hidrocarbonado mono o policíclico opcionalmente sustituido que comprende entre 4 y 50 átomos de carbono, o un correspondiente birradical heteromonocíclico o heteropolicíclico en el que al menos 1 CH_2 ó CH_2 está sustituido por un átomo de oxígeno, de azufre o de nitrógeno, o un grupo NH; y

20

C es un grupo para la reacción con un compuesto, para unir covalentemente dicho compuesto a dicho hidrogel) para formar un producto polimerizado, caracterizada porque esa polimerización se lleva a cabo en, e inmoviliza el producto polimerizado a, un soporte sólido que no está modificado covalentemente en su superficie.

25

17. Un procedimiento para generar un molde para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende,

30

(i) proporcionar al menos una molécula de un ácido nucleico bicatenario, en la que ambas hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario están unidas a un soporte sólido por el extremo 5',

(ii) escindir una o ambas de las hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario, y

(iii) someter la(s) hebra(s) escindida(s) a unas condiciones desnaturalizantes para eliminar la porción de la(s) hebra(s) escindida(s) que no está(n) unida(s) al soporte sólido, generando así un molde parcialmente o sustancialmente monocatenario para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos, caracterizado porque la etapa (ii) no comprende la escisión con una endonucleasa de restricción ni con una endonucleasa de corte.

35

18. Un procedimiento según el párrafo 17 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario es escindida en un sitio de escisión predeterminado.

40

19. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario es escindida en una o en ambas hebras a través de una reacción de escisión química.

45

20. Un procedimiento según el párrafo 19 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende un conector de diol y la etapa (ii) comprende la escisión de esta hebra en el conector de diol mediante tratamiento con peryodato.

50

21. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que la etapa (ii) comprende el tratamiento de una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario para generar un sitio abásico y después escindir en el sitio abásico.

22. Un procedimiento según el párrafo 21 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una base de uracilo y el sitio abásico se genera mediante tratamiento con glucosilasa de uracilo.

55

23. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende uno o más ribonucleótidos, y la etapa (ii) comprende la escisión de esta hebra en un enlace fosfodiéster entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido.

60

24. Un procedimiento según el párrafo 23 en el que la etapa (ii) comprende la exposición a un ión metálico, preferiblemente, un ión de un metal lantánido.

25. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende uno o más nucleótidos metilados, y la etapa (ii) comprende la escisión de esta hebra usando una enzima específica para una secuencia de reconocimiento que incluya dicho(s) nucleótido(s) metilado(s).

26. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que la etapa (ii) comprende la escisión de una o de ambas hebras del ácido nucleico bicatenario mediante un mecanismo fotoquímico.
- 5 27. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene un péptido unido covalentemente en el extremo 5', y la etapa (ii) comprende la escisión del péptido.
- 10 28. Un procedimiento según el párrafo 17 o el párrafo 18 en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende dos o más ribonucleótidos consecutivos, y la etapa (ii) comprende la escisión con una ribonucleasa.
29. Un procedimiento según el párrafo 28 en el que la ribonucleasa es ARNasaA.
- 15 30. Un procedimiento según uno cualquiera de los párrafos precedentes en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario forma parte de una matriz agregada de moléculas de ácidos nucleicos.
31. Un procedimiento según el párrafo 30 en el que la matriz agregada se forma mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida.
- 20 32. Un procedimiento según el párrafo 6 o el párrafo 22 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario forma parte de una matriz agregada de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios, y una hebra de cada una de dichas moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios incluye una base de uracilo.
- 25 33. Un procedimiento según el párrafo 32 en el que dicha matriz agregada se prepara mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida usando cebadores de amplificación directos e inversos unidos a dicho soporte sólido por el extremo 5' y dicha base de uracilo está presente en cualquiera de dichos cebadores de amplificación directos o inversos.
- 30 34. Un procedimiento según el párrafo 33 en el que dicha base de uracilo está presente como la base terminal en 3' en cualquiera de dichos cebadores de amplificación directos o inversos.
- 35 35. Un procedimiento según el párrafo 1, 2, 17 ó 18 en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario forma parte de una matriz agregada de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios preparada mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida usando cebadores de amplificación directos e inversos unidos a dicho soporte sólido por el extremo 5' y cualquiera de dichos cebadores directos o inversos incluye un finalizador de PCR.
- 40 36. Un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende formar un molde para la secuenciación de ácidos nucleicos usando el procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 35 y realizar una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos para determinar la secuencia de al menos una región del molde.
- 45 37. Un procedimiento según el párrafo 36 en el que la reacción de secuenciación de ácidos nucleicos comprende hibridar un cebador de secuenciación a una región monocatenaria del molde generado en la etapa (iii), incorporar secuencialmente uno o más nucleótidos en una hebra de polinucleótidos complementaria de la región del molde que se va a secuenciar, identificar la base presente en uno o más del (los) nucleótido(s) incorporado(s) y determinar así la secuencia de una región del molde.
- 50 38. Un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende formar un molde para la secuenciación de ácidos nucleicos usando un procedimiento que comprende las etapas (i) y (ii) únicamente del procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 5, 6, 21, 22 ó 32 a 34, llevando a cabo una reacción de secuenciación por desplazamiento de hebra mediante la adición secuencial de uno o más nucleótidos a un grupo hidroxilo libre en 3' generado en la hebra escindida en la etapa (ii), identificar la base presente en uno o más del (los) nucleótido(s) incorporado(s) y determinar así la secuencia de una región del molde.

LISTA DE SECUENCIAS

55

[0256]

<110> Solexa Limited

60

<120> Preparación de moldes para la secuenciación de ácidos nucleicos

<130> NLW/P79981WO00

<160> 8

65

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

10

<400> 1

tcggtggtcg ccgtatcatt

15 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 2

25 gtagactgca tgacctgtag

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

35 <400> 3

ttttttttt aatgatacgg cgaccaccga

<210> 4

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 4

aatgatacgg cgaccaccga

50

<210> 5

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

<400> 5

60 ttttttttt caagcagaag acggcatacg a

<210> 6

<211> 38

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 398 808 T3

<220>

<223> Cebador de secuenciación

5 <400> 6

ctggcagcagc aggttcccg actggaagc gggcagtg

<210> 7

10 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador de secuenciación

<400> 7

acactcttc cctacagcagc gctctccga tc

20

<210> 8

<211> 364

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Molde para la generación del agregado de ácidos nucleicos

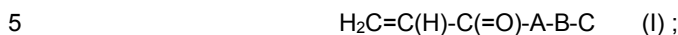
<400> 8

caagcagaag acggcatacg agcatagaga cggagagaag atcggaagag cgtcgtgtag	60
ggaaagagtg tgagatcttt tatcatctcc ataaaacaaa acccgccgta gcgagttcag	120
ataaaataaa tccccgcgag tgcgaggatt gttatgtaat attgggttta atcatctata	180
tgttttgtac agagagggca agtatcgttt ccaccgtact cgtgataata attttgcacg	240
gtatcagtca tttctgcac attgcagaat ggggatttgt cttcattaga cttataaacc	300
ttcatggaat atttgtatgc cgactctata tctatacctt catctcggtg gtcgccgtat	360
catt	364

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para generar una plantilla para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende,
- 5 (i) proporcionar al menos una molécula de ácido nucleico bicatenario unida a un soporte sólido por el extremo 5', en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una región diana a ser secuenciada y secuencias no diana que flanquean a la región diana,
- 10 (ii) escindir una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario, en un sitio abásico, en el que el sitio para la escisión está ubicado en la secuencia no objetivo, y
- (iii) someter la hebra escindida a unas condiciones desnaturalizantes para eliminar la porción de la hebra escindida que no está unida al soporte sólido, generando así un molde monocatenario para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo mediante el tratamiento con una endonucleasa, calor o un álcali.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una hebra de la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una base de uracilo y el sitio abásico se genera mediante el tratamiento con uracilo glucosilasa; o en el que la
- 20 molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una 8-oxo-guanina y el sitio abásico se genera mediante el tratamiento con FPG glucosilasa; o en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una desoxiinosina y el sitio abásico se genera mediante el tratamiento con AlkA glucosilasa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende un uracilo,
- 25 una 8-oxo-guanina o una desoxiinosina y el sitio abásico se forma en el sitio del uracilo, la 8-oxo-guanina o la desoxiinosina.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sitio abásico es generado por una glucosilasa y el sitio abásico es escindido por una endonucleasa.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la escisión se lleva a cabo mediante la exposición a una mezcla de la glucosilasa y la endonucleasa.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la molécula de ácido nucleico bicatenario
- 35 forma parte de una matriz agregada de moléculas de ácidos nucleicos.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la matriz agregada se prepara mediante amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida usando cebadores de amplificación directos e inversos unidos al soporte sólido por el extremo 5' y hay presente una 8-oxo-guanina, una desoxiinosina o un uracilo en los cebadores de amplificación ya
- 40 sean directos o inversos.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la 8-oxo-guanina, la desoxiinosina o el uracilo está presente como la base terminal 3' en los cebadores de amplificación ya sean directos o inversos.
- 45 10. Un procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende formar una plantilla para la secuenciación de ácidos nucleicos usando el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y realizar una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos para determinar la secuencia de al menos una región de la plantilla.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la reacción de secuenciación de ácidos nucleicos comprende hibridar un cebador de secuenciación con una región monocatenaria de la plantilla generada en la etapa (iii), incorporar secuencialmente uno o más nucleótidos en una hebra de polinucleótidos complementaria de la región de la plantilla a ser secuenciada, identificar la base presente en uno o más del (los) nucleótido(s) incorporado(s) y determinar así la secuencia de una región de la plantilla.
- 55 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el soporte sólido está recubierto con silanos funcionalizados.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el soporte sólido es un hidrogel de
- 60 poliacrilamida sobre soporte sólido.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el hidrogel sobre soporte sólido se prepara mediante un procedimiento que comprende polimerizar sobre un soporte sólido una mezcla de:

- (i) un primer comonomero que es acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo o N-vinil pirrolidinona;
y
(ii) un segundo comonomero que es una acrilamida funcionalizada o un acrilato de fórmula (I):



o un metacrilato o una metacrilamida de fórmula (II):



en las que:

15 A es NR u O, en la que R es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo saturado opcionalmente sustituido que comprende entre 1 y 5 átomos de carbono;

-B- es un birradical alquileo opcionalmente sustituido de fórmula $-(\text{CH}_2)_n-$ en la que n es un número entero entre 1 y 50; y en la que $n = 2$ o más, uno o más birradicales etileno opcionalmente sustituidos $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ de dicho birradical alquileo pueden sustituirse independientemente por porciones de etinileno y etinileno; y en la que $n = 1$ o más, uno o más birradicales metileno $-\text{CH}_2-$ pueden sustituirse independientemente por un birradical hidrocarbonado mono o policíclico opcionalmente sustituido que comprende de 4 a 50 átomos de carbono, o un correspondiente birradical heteromonocíclico o heteropolicíclico en el que al menos 1 CH_2 ó CH_2 está sustituido por un átomo de oxígeno, de azufre o de nitrógeno, o un grupo NH; y

20 C es un grupo para la reacción con un compuesto, para unir covalentemente dicho compuesto a dicho hidrogel para formar un producto polimerizado,

25 caracterizada porque la polimerización se realiza en, e inmoviliza el producto polimerizado a, un soporte sólido que no está modificado covalentemente en su superficie.

30 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el soporte sólido es plano.

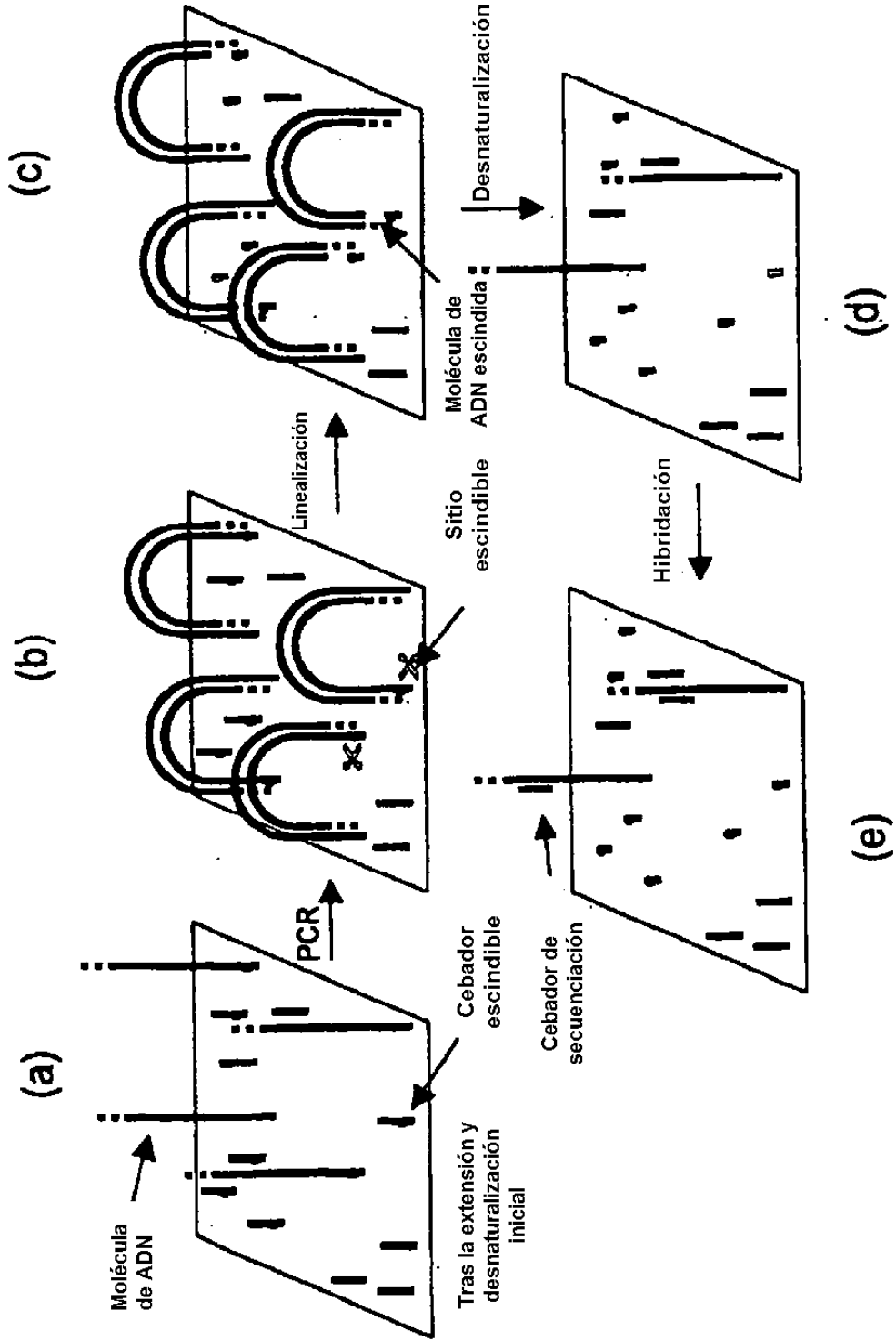


FIG. 1

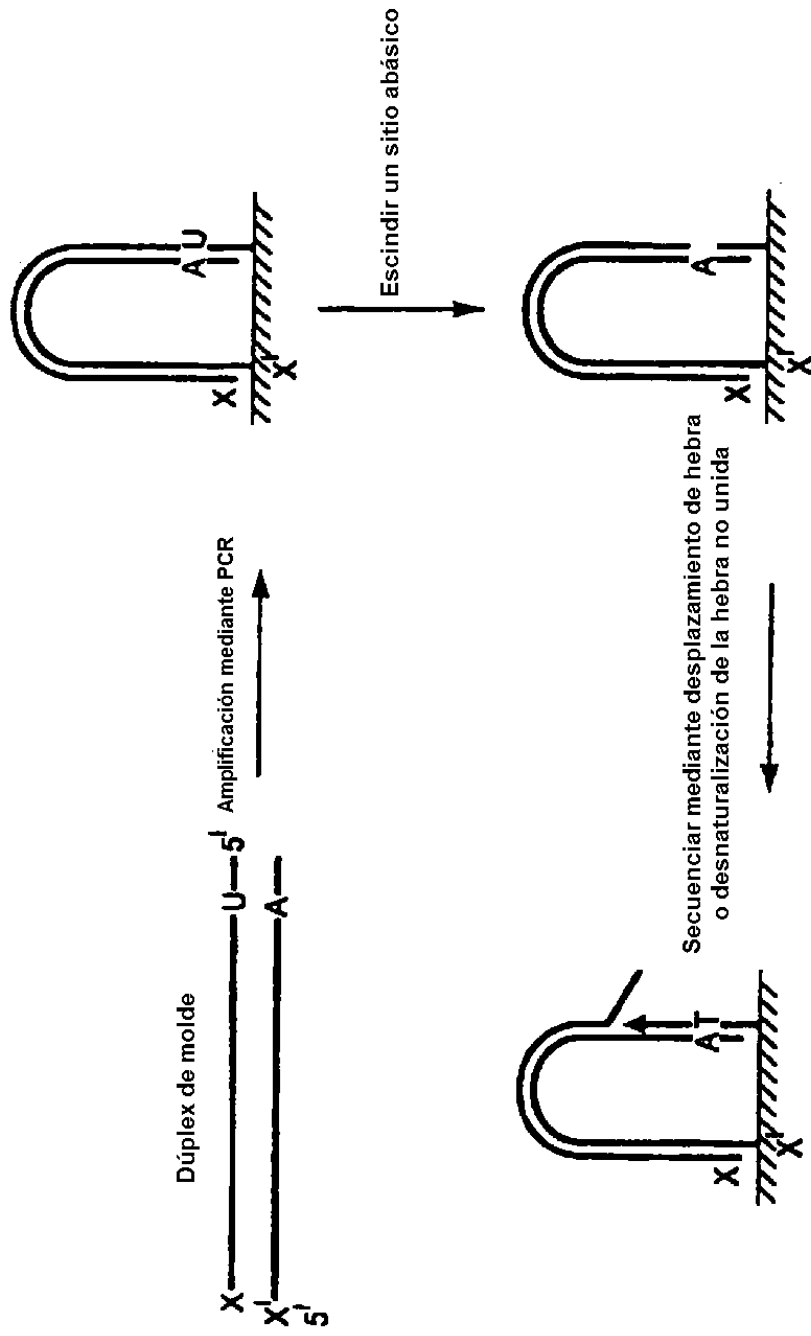


FIG. 2

P5 **BglII** **Cebador de secuenciación** **400-700bp**
 aatgatacggcgaccaccggagcaactctggcaacgacaggttccccgactggaaaggggcagtggtat-genomic-atctcgtatgccgtcttctgcttgg
 ttactatgccgctggtaggcctctgacccgctgctgtcccaagggtgaccttgcgccgtcaccta-genomic-tagagcatabcggcagagacgaac
P7

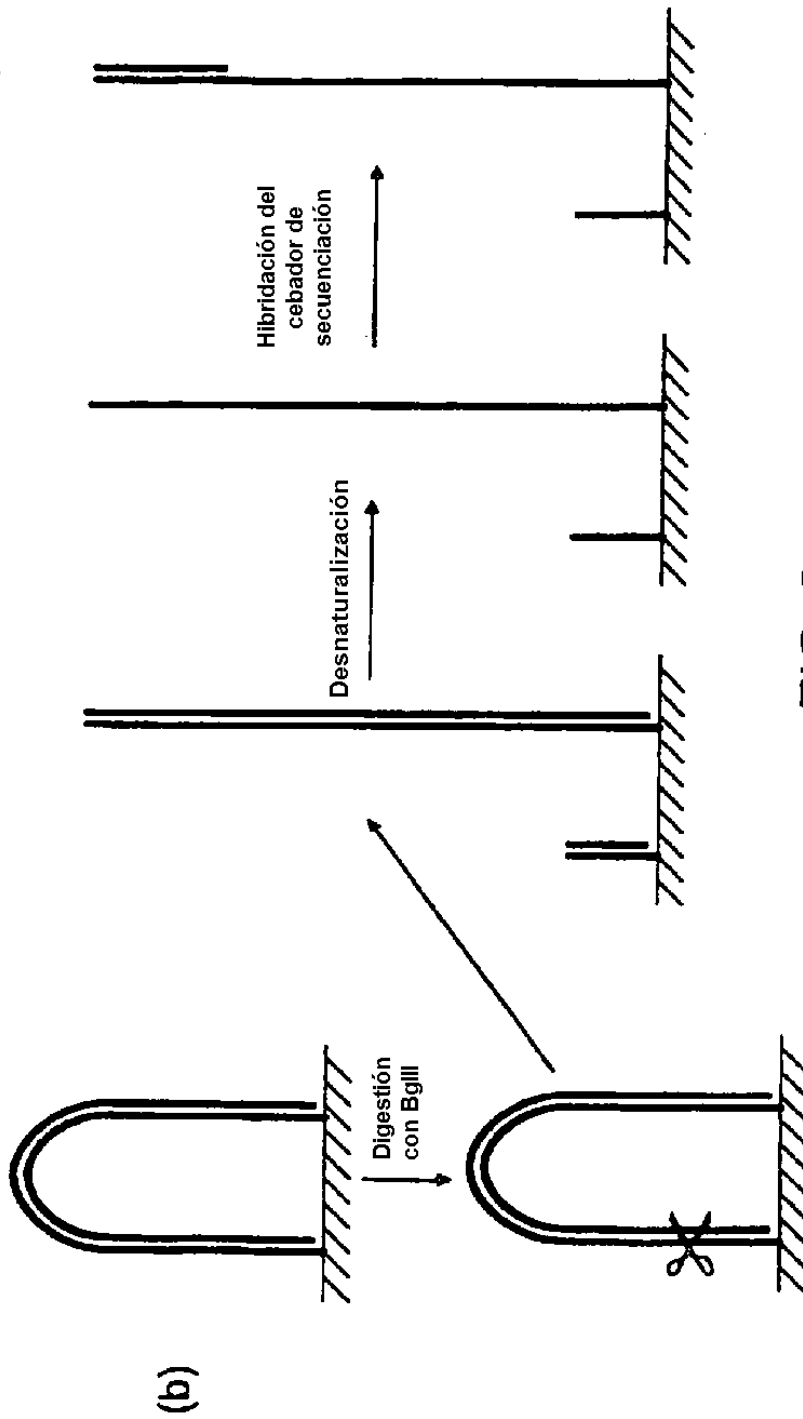


FIG. 3

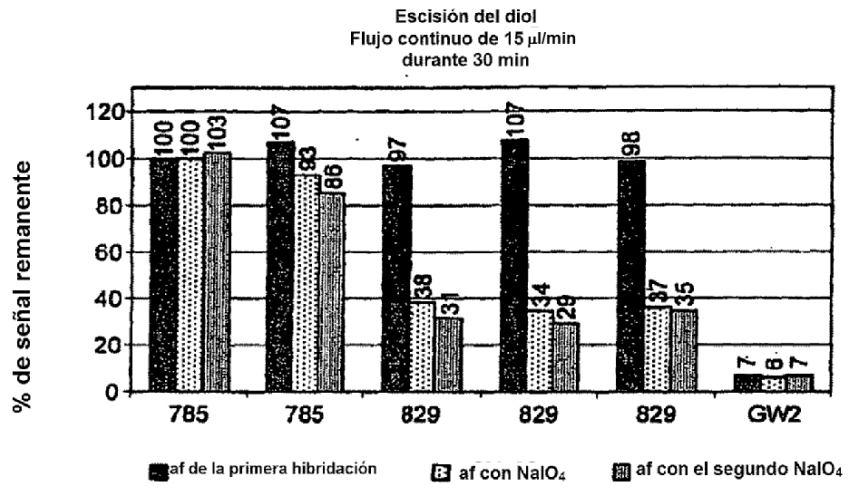


FIG. 4

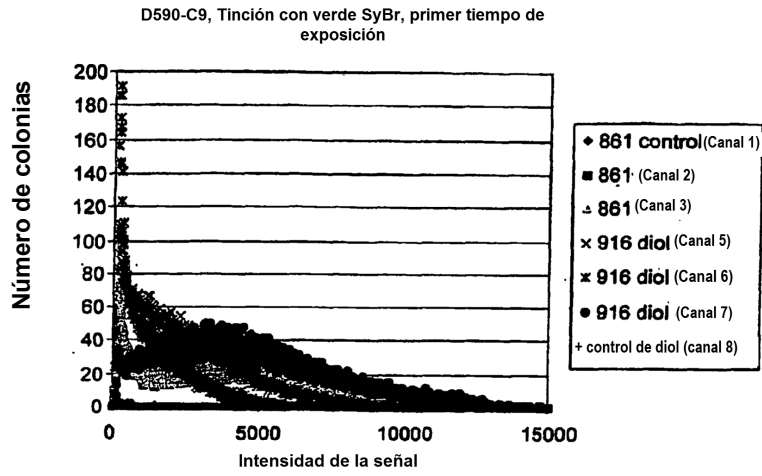


FIG. 5

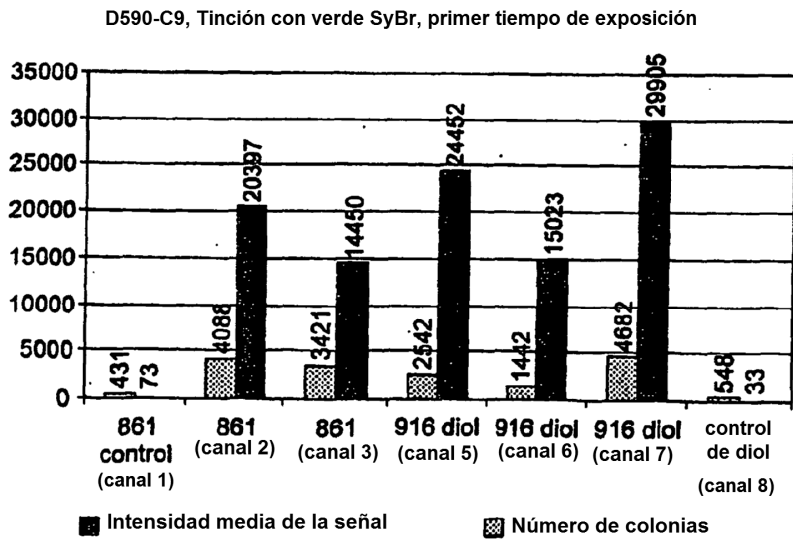


FIG. 6

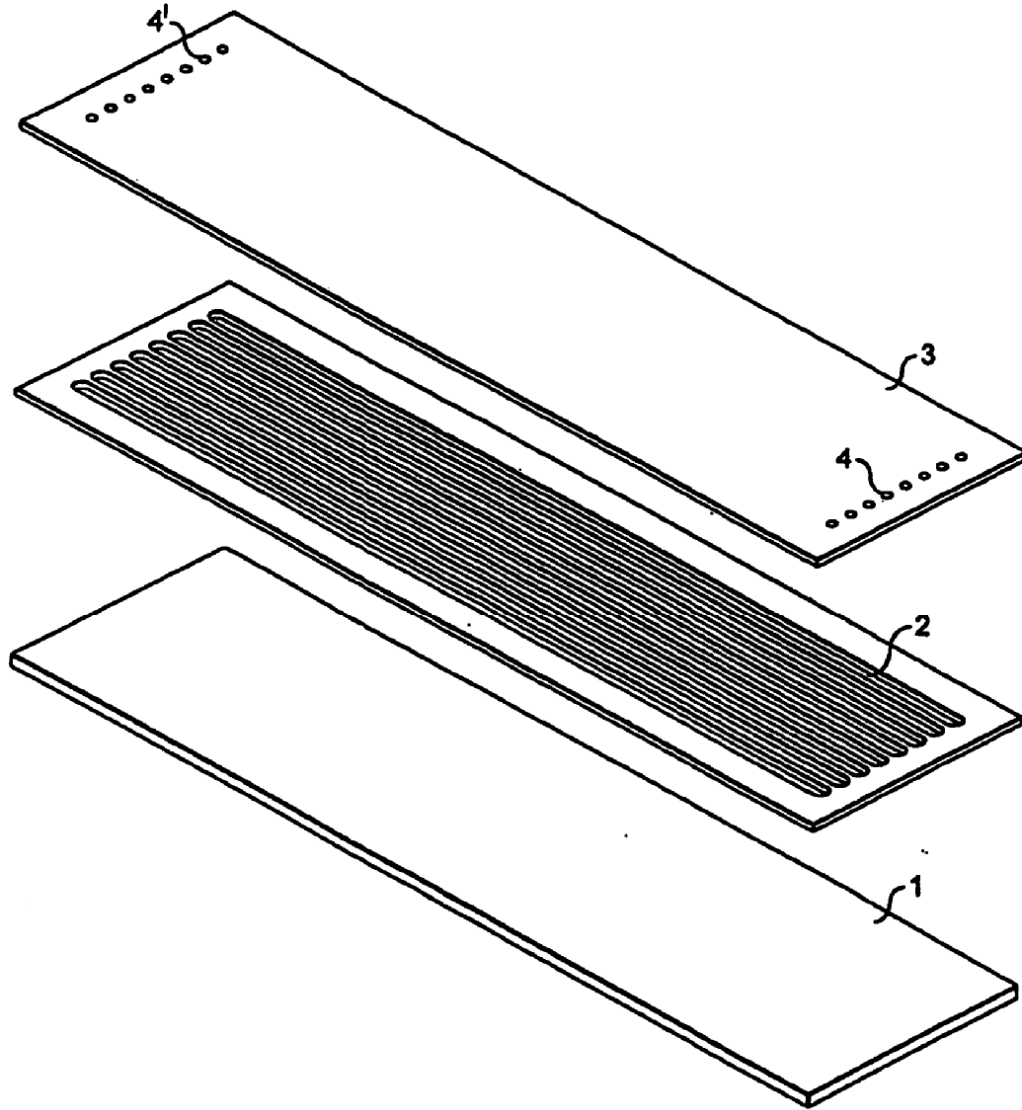


FIG. 7

EP 2 298 930 B1



Cebador P7 Inserto Cebador de secuenciación Cebador P5

1 CAAGCAGAG ACGGCATACG AGCATAGAGA CCGAGAGAG ATCCGAGAG CGTCGTGTAG GBRAGAGTG TGRGATCTTT TATCACTCC ATAAACAAA
GTTGGTCTTC TGCCGTAIGC TCGTATCTCT GGCCTCTCTC TAGCCTCTC GCAGCAGATC CTTTCTCCAC ACTCTAGAAA ATAGTAGAGG TATTTGTTT

101 ACCCGCCGTA GCGAGTTGAG ATAAATATA TCCCGCGGAG TCGGAGGATT GTATGTAT ATTTGGTTTA ATCATCTATA TGTTTGTAC AGAGAGGCA
TGGGGGCAT CGCTCAATC TATTTTATTT AGGSGGCTC ACGTCTTAA CAATACATA TAACCAAT TAGTAGATAT ACAAACATG TCCTCCCGT

201 AGTATCGTTT CCACCGTACT CGTGATATA ATTTGCAG GTATCAGTCA TTCTCGCAC ATTGCAGAT GGGATTGT CTTCATAGA CTTATTAACC
TCATACCANA GGTGGCATGA GCATATAT TAAACGTGC CATAGTCAGT AAGAGCGTG TAACGTCTTA CCCATAACA GAAGTATCT GAATATTTGG

301 TTCAATGAT ATTTGATGC CGACTCTATA TCTATACCTT CATCTCGTG GTCGCCGTAT CATI
AAGTACTTA TAAACATACG GCTGAGATAT AGATATGGAA GTAGAGCCAC CAGCGGATA GATA

Cebador de secuenciación para el inserto: 5' ACACCTTTCCCTACAGACCGCTCTCCGATC 3

FIG. 8



FIG. 9

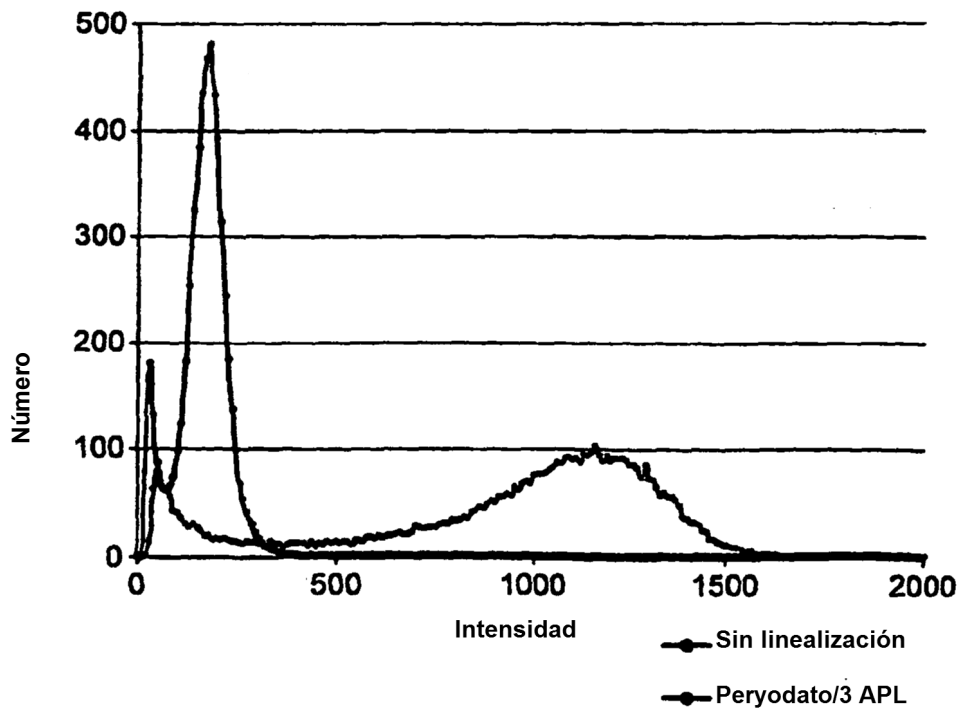


FIG. 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5302509 A [0004]
- WO 9844151 A [0006] [0007] [0106] [0107] [0121] [0128] [0163]
- WO 0018957 A [0006] [0007] [0106] [0107] [0120] [0128] [0163]
- WO 9844152 A [0006]
- WO 0053617 A [0011]
- US 6372813 B [0097]
- WO 0101143 A [0097]
- WO 0212566 A [0097]
- WO 03014394 A [0097]
- WO 2004018493 A [0245]

10

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- CHEN et al. *Biotechniques*, 2002, vol. 32, 518-520 [0054]
- KOMIYAMA et al. *Chem. Commun.*, 1999, 1443-1451 [0054]
- SHIDA. *Nucleic Acids Research*, 1996, vol. 24, 4572-4576 [0068]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0074] [0082]
- KARION et al. *Nucl. Acids Res.*, 2001, vol. 29 (12), 2456-2463 [0143]
- BREVNOV M. G. et al. *Nucl. Acids Res.*, 1997, vol. 25 (16), 3302-3309 [0143]
- OLLIVIER N. et al. *Tet. Lett.*, 2002, vol. 43, 997-999 [0143]
- MELNYK O. et al. *J. Org. Chem.*, 2001, vol. 66 (12), 4153-4160 [0143]

15