

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 681**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06	(2006.01)
C07H 19/10	(2006.01)
C07H 19/16	(2006.01)
C07H 19/20	(2006.01)
C07H 21/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2003 E 03792519 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1530578**

54 Título: **Nucleótidos modificados para la secuenciación de polinucleótidos.**

30 Prioridad:

23.08.2002 US 227131
23.12.2002 GB 0230037
20.02.2003 GB 0303924

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MILTON, JOHN;
WU, XIAOLIN;
SMITH, MARK;
BRENNAN, JOSEPH;
BARNES, COLIN;
LIU, XIAOHAI y
RUEDIGER, SILKE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 407 681 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

Nucleótidos modificados para la secuenciación de polinucleótidos

- 5 La invención se relaciona con nucleótidos modificados. Particularmente, esta invención describe nucleótidos que tienen un grupo protector removible, su uso en los métodos de secuenciación de polinucleótidos y un método para la desprotección química del grupo protector.
- 10 Los avances en el estudio de moléculas se han dirigido, en parte, por el mejoramiento en las tecnologías usadas para caracterizar las moléculas o sus reacciones biológicas. En particular, el estudio de los ácidos nucleicos ADN y ARN se ha beneficiado de tecnologías en desarrollo usadas para el análisis de secuencia y el estudio de eventos de hibridación.
- 15 Un ejemplo de las tecnologías que han mejorado el estudio de los ácidos nucleicos es el desarrollo de matrices fabricadas de ácidos nucleicos inmovilizados. Estas matrices consisten típicamente en una matriz de alta densidad de polinucleótidos inmovilizados sobre un material de soporte sólido. Ver, por ejemplo, Fodor y otros, Trends Biotech. 12:19-26, 1994, que describe formas de ensamblar los ácidos nucleicos usando una superficie de vidrio sensibilizada químicamente protegida por una máscara, pero expuesta en áreas definidas para permitir la unión de fosforamiditas de nucleótidos modificados adecuadamente. Las matrices fabricadas también se pueden producir mediante la técnica de "impresión" de polinucleótidos conocidos sobre un soporte sólido en posiciones predeterminadas (por ejemplo, Stimpson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 92:6379-6383, 1995).
- 20 La secuenciación por síntesis de ADN requiere idealmente la incorporación controlada (es decir, uno a la vez) del nucleótido complementario correcto opuesto al oligonucleótido que está siendo secuenciado. Esto permite la secuenciación precisa mediante la adición de nucleótidos en múltiples ciclos ya que cada residuo de nucleótido se secuencia de uno en uno, evitando así que ocurra una serie no controlada de incorporaciones. El nucleótido incorporado se lee usando un marcador adecuado unido a este antes de la separación de la porción del marcador y la siguiente ronda posterior de la secuenciación. Con el fin de garantizar que se produzca solamente una única incorporación, se requiere una modificación estructural ("grupo de bloqueo") de los nucleótidos de secuenciación para asegurar una incorporación de un único nucleótido, pero esto impide después cualquier incorporación de nucleótidos adicional en la cadena de polinucleótidos. El grupo de bloqueo debe entonces ser eliminado, bajo condiciones de reacción que no interfieren con la integridad del ADN que se secuencia. El ciclo de secuenciación puede continuar después con la incorporación del siguiente nucleótido marcado, bloqueado. Con el fin de ser de uso práctico, el proceso entero debe consistir en etapas enzimáticas y químicas altamente específicas, y de alto rendimiento para facilitar múltiples ciclos de secuenciación.
- 25 30 35 Para ser útiles en la secuenciación del ADN, los nucleótidos, y más usualmente los trifosfatos de nucleótidos, generalmente requieren un grupo de bloqueo 3' OH para evitar que la polimerasa usada para incorporarla en una cadena de polinucleótidos continúe replicándose una vez que se añade la base en el nucleótido. Existen muchas limitaciones sobre la idoneidad de una molécula como un grupo de bloqueo. Esta debe ser tal como para impedir que las moléculas de nucleótido adicionales se añadan a la cadena de polinucleótidos mientras que al mismo tiempo sean fácilmente extraíbles de la porción de azúcar sin causar daño a la cadena de polinucleótidos. Además, el nucleótido modificado debe ser tolerado por la polimerasa u otra enzima adecuada que se usa para incorporar en la cadena de polinucleótidos. El grupo de bloqueo ideal por lo tanto exhibirá una estabilidad a largo plazo, eficientemente incorporado por la enzima polimerasa, causará un bloqueo total de incorporación secundaria o adicional y tendrá la capacidad de ser eliminado bajo condiciones suaves que no causen daño a la estructura del polinucleótido, preferentemente en condiciones acuosas. Estos estrictos requerimientos son obstáculos formidables para el diseño y la síntesis de los nucleótidos modificados requeridos.
- 40 45 50 Los grupos de bloqueo reversibles para este fin se han descrito anteriormente, pero ninguno de ellos generalmente reúne los criterios anteriores para los polinucleótidos, por ejemplo, la química compatible con el ADN.
- 55 Metzker y otros, (Nucleic Acids Research, 22(20): 4259-4267, 1994) describe la síntesis y uso de ocho 5'-trifosfatos de 2-deoxiribonucleósido 3'-modificado (dNTP 3'-modificado) y la prueba en dos ensayos del molde de ADN para la actividad de incorporación. Los dNTP 3' modificados incluyen el 3' alil 5'-trifosfato de deoxiriboadenosina (3'-alil dATP). Sin embargo, el compuesto 3' alilo bloqueado no se usó para demostrar un ciclo completo de la terminación, la desprotección y la reiniciación de la síntesis de ADN: los únicos resultados de la prueba presentados fueron los que mostraron la capacidad de este compuesto para terminar la síntesis de ADN en un ensayo único de terminación, de esos ocho ensayos realizados, cada uno con una ADN polimerasa diferente.

5 La solicitud de patente internacional WO02/29003 (The Trustees of Columbia University in the City of New York) describe un método de secuenciación el cual, puede incluir el uso de un grupo protector alilo para tapar el grupo 3'-OH en una cadena creciente de ADN en una reacción de la polimerasa. El grupo alilo se introduce de acuerdo con el procedimiento de Metzker (más abajo) y se dice que se eliminó usando la metodología reportada por Kamal y otros (Tet. Let, 40, 371-372, 1999).

10 La metodología de desprotección de Kamal emplea yoduro de sodio y clorotrimetilsilano a fin de generar yodotrimetilsilano *in situ*, en disolvente de acetonitrilo, inactivando el tiosulfato de sodio. Después de la extracción en acetato de etilo y el secado (sulfato de sodio), a continuación la concentración a presión reducida y la cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano; 2:3 como eluyente), se obtuvieron alcoholes libres al 90-98% de rendimiento.

15 En WO02/29003, la desprotección del alilo de Kamal se sugiere como directamente aplicable en la secuenciación del ADN sin modificación, siendo las condiciones de Kamal suaves y específicas.

20 Aunque Metzker informa la preparación de un nucleótido o el nucleósido 3' alilo bloqueado y la solicitud de patente internacional WO02/29003 sugiere el uso de la funcionalidad alilo como una caperuza 3' OH durante la secuenciación, ninguno de estos documentos enseña realmente la desprotección del grupo hidroxilo 3'-alilado en el contexto de un protocolo de secuenciación. Aunque el uso de un grupo alilo como un grupo protector de hidroxilo es bien conocido es fácil de introducir y es estable a través de todo el intervalo de pH y a temperaturas elevadas, no existe hasta la fecha, una modalidad concreta de la escisión exitosa de un grupo 3' alilo en condiciones compatibles del ADN, es decir, las condiciones en las que la integridad del ADN no esté total o parcialmente destruida. En otras palabras, no ha sido posible hasta ahora usar nucleótidos 3' alilo OH bloqueados para llevar a cabo la secuenciación del ADN.

25 La metodología de Kamal es inadecuada para realizarla en medios acuosos, ya que el cloruro de TMS se hidrolizará previniendo la generación *in situ* de yoduro de TMS. Los intentos para llevar a cabo la desprotección de Kamal (en acetonitrilo) en la secuenciación no han tenido éxito en nuestras manos.

30 La presente invención se basa en el sorprendente desarrollo de un número de grupos de bloqueo reversibles y los métodos de desprotección de ellos en condiciones compatibles con el ADN. Algunos de estos grupos de bloqueo son nuevos per se, mientras que otros se han descrito en la técnica anterior, pero, como se señaló anteriormente, no ha sido posible usar estos grupos de bloqueo en la secuenciación del ADN.

35 Una característica de la invención se deriva del desarrollo de un método completamente nuevo de desprotección de alilo. Nuestro procedimiento es de amplia aplicabilidad para la desprotección de prácticamente toda la funcionalidad del hidroxilo protegido con alilo y se puede efectuar en solución acuosa, en contraste a la metodología de Kamal y otros (que se lleva a cabo en acetonitrilo) y a los otros métodos conocidos generalmente en la técnica anterior que son altamente sensibles al oxígeno y a la humedad. Una característica adicional de la invención se deriva de la elaboración de una nueva clase de grupos protectores. Estos se basan en acetales y grupos protectores relacionados, pero que no sufren de algunas de las desventajas de la desprotección del acetal conocida en la técnica anterior.

40 La metodología de desprotección de alilo hace uso de un catalizador de metal de transición soluble en agua formado a partir de un metal de transición y ligandos al menos parcialmente solubles en agua. En solución acuosa, estos forman complejos de metales de transición al menos parcialmente solubles en agua. Por solución acuosa en la presente descripción se entiende un líquido que comprende al menos 20 % en vol, preferentemente al menos 50%, por ejemplo al menos 75 % en vol, particularmente al menos 95 % en vol y especialmente mayor que por encima de 98 % en vol, idealmente 100 % en vol de agua como la fase continua.

45 Como los expertos en la técnica apreciarán, el grupo alilo puede ser usado no solamente para proteger el grupo hidroxilo sino también las funcionalidades tiol y amina. Además se pueden formar ésteres alílicos a partir de la reacción entre ácidos carboxílicos y haluros de alilo, por ejemplo. Las amidas primarias o secundarias también pueden protegerse usando métodos conocidos en la técnica. La nueva metodología de desprotección descrita en la presente se puede usar en la desprotección de todos estos compuestos alilados, por ejemplo, ésteres de alilo y aminas primarias mono o bi-aliladas o amidas aliladas, o en la desprotección de aminas secundarias aliladas. El método también es adecuado en la desprotección de ésteres y tioésteres de alilo.

50 Los grupos protectores que comprenden la funcionalidad acetal se han usado anteriormente como grupos de bloqueo. Sin embargo, la eliminación de tales grupos y éteres requiere desprotecciones fuertemente ácidas perjudiciales para las moléculas de ADN. La hidrólisis de un acetal sin embargo, resulta en la formación de un intermediario inestable

5 hemiacetal que se hidroliza bajo condiciones acuosas para el grupo hidroxilo natural. Los inventores han usado este concepto y se aplica adicionalmente de tal manera que esta característica de la invención reside en la utilización de grupos de bloqueo que incluyen grupos protectores para proteger moléculas intermedias que normalmente se hidrolizan en condiciones acuosas. Estos grupos protectores comprenden un segundo grupo funcional que estabiliza la estructura del intermediario pero que pueden ser eliminados en una etapa posterior seguida de la incorporación en el polinucleótido. Los grupos protectores se han usado en reacciones de síntesis orgánica para enmascarar temporalmente la química característica de un grupo funcional, porque interfiere con otra reacción.

10 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, se proporciona una molécula de nucleótido o nucleósido modificado que comprende una base de purina o pirimidina y una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa que tiene un grupo de bloqueo 3'-OH removible unido covalentemente a ella, de tal manera que el átomo de carbono 3' tiene unido un grupo de la estructura



15 en donde Z es cualquiera de $-C(R')_2-O-R''$, $-C(R')_2-N(R'')_2$, $-C(R')_2-N(H)R''$, $-C(R')_2-S-R''$ y $-C(R')_2-F$, en donde cada R'' es, o es parte de un grupo protector removible;

20 cada R' es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heterocíclico, acilo, ciano, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi o amido, o un marcado detectable unido a través de un grupo de enlace; o (R'')₂ representa un grupo alquilideno de la fórmula $=C(R''')_2$ en donde cada R''' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y en donde dicha molécula puede reaccionar para producir un producto intermedio en el cual cada R'' se intercambia por H o, donde Z es $-C(R')_2-F$, el F se intercambia por OH, SH o NH₂, preferentemente OH, dicho producto intermedio se disocia bajo condiciones acuosas para proporcionar una molécula con un 3'OH libre;

25 siempre que donde Z sea $-C(R')_2-S-R''$, ambos grupos R' no son H.

30 Visto desde otro aspecto, la descripción proporciona un nucleótido o nucleósido 3'-O-alilo cuyo nucleótido o nucleósido comprende un marcador detectable unido a la base del nucleósido o nucleótido, preferentemente por un enlazador escindible.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende un nucleótido o nucleósido 3'-O-alilo cuyo nucleótido o nucleósido comprende un marcador detectable unido a la base del nucleósido o nucleótido, preferentemente por un enlazador escindible.

35 Visto aún desde otro aspecto adicional, la descripción proporciona un método para convertir un compuesto de la fórmula R-O-alilo, R₂N (alilo), RNH (alilo), RN (alilo)₂ o R-S-alilo en un compuesto correspondiente en el cual el grupo alilo se elimina y se reemplaza por hidrógeno, dicho método comprende las etapas de reaccionar un compuesto de la fórmula R-O-alilo, R₂N (alilo), RNH(alilo), RN (alilo)₂ o R-S-alilo en solución acuosa con un metal de transición que comprende un metal de transición y uno o más ligandos seleccionados del grupo que comprende fosfina soluble en agua y ligandos de fosfina que contienen nitrógeno solubles en agua, en donde el o cada R es una molécula biológica soluble en agua.

40

45 En un aspecto adicional la descripción proporciona un método para controlar la incorporación de una molécula de nucleótido complementaria al nucleótido en un polinucleótido objetivo de cadena sencilla en una reacción de secuenciación o síntesis que comprende incorporar en el polinucleótido creciente complementario una molécula de acuerdo con la invención, la incorporación de dicha molécula previene o bloquea la introducción de moléculas de nucleósidos o nucleótidos posteriores en dicho polinucleótido creciente complementario.

50 En un aspecto adicional la descripción proporciona un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla, que comprende monitorear la incorporación secuencial de nucleótidos complementarios, en donde al menos una incorporación, y preferentemente todas las incorporaciones es de un nucleótido de acuerdo con la invención como se describió anteriormente que comprende preferentemente un marcador detectable unido a la base de los nucleósidos o nucleótido por un enlazador escindible y en donde la identidad del nucleótido incorporado se determina detectando el marcador, dicho grupo de bloqueo y dicho marcador se eliminan antes de la introducción del siguiente nucleótido complementario.

55

A partir de un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla, que comprende:

- (a) proporcionar una pluralidad de diferentes nucleótidos de conformidad con la invención anteriormente descrita donde los nucleótidos están unidos preferentemente de la base a un marcador detectable por un enlazador escindible y en donde el marcador detectable unido a cada tipo de nucleótido puede distinguirse tras la detección del marcador detectable usado para otros tipos de nucleótidos;
- (b) incorporar el nucleótido en el complemento del polinucleótido objetivo de cadena sencilla;
- (c) detectar el marcador del nucleótido de (b), y de ese modo determinar el tipo de nucleótido incorporado;
- (d) eliminar el marcador del nucleótido de (b) y el grupo de bloqueo; y
- (e) opcionalmente repetir las Etapas (b)-(d) una o más veces;
- y de ese modo determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla.

Además, en otro aspecto, la descripción proporciona un estuche, que comprende:

- (a) una pluralidad de nucleótidos individuales diferentes de la invención; y
- (b) materiales de empaque para ello.

Los nucleósidos o nucleótidos de acuerdo con o usados en los métodos de la presente descripción comprenden una base de purina o pirimidina y una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa que tiene un grupo de bloqueo unido covalentemente a ella, preferentemente en la posición 3'O, que hace las moléculas útiles en las técnicas que requieren el bloqueo del grupo 3'-OH para evitar la incorporación de nucleótidos adicionales, como por ejemplo en reacciones de secuenciación, la síntesis de polinucleótidos, la amplificación de ácidos nucleicos, los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, los estudios de polimorfismo de un solo nucleótido y otras técnicas similares.

Donde el término "grupo de bloqueo" se usa en la presente descripción, este abarca tanto los grupos de bloqueo alilo y "Z" descritos en la presente. Sin embargo, se apreciará que, en los métodos como se describen y reivindican en la presente, donde se usan las mezclas de nucleótidos, estos muy preferentemente comprenden cada uno el mismo tipo de bloqueo, es decir, alilo bloqueado o "Z" bloqueado. Donde se usan los nucleótidos "Z" bloqueados, cada grupo "Z" será generalmente el mismo grupo, excepto en aquellos casos donde el marcador detectable forma parte del grupo "Z", es decir, no está unido a la base.

Una vez que se elimina el grupo de bloqueo, es posible incorporar otro nucleótido para el grupo 3'-OH libre.

La molécula puede estar unida a través de la base a un marcador detectable por un enlazador deseable, cuyo marcador puede ser un fluoróforo, por ejemplo. El marcador detectable puede en cambio, si se desea, ser incorporado en los grupos de bloqueo de la fórmula "Z". El enlazador puede ser sensible en medio ácido, fotolábil o contener, un enlace disulfuro. Otros enlaces, en particular los enlazadores fosfina escindibles que contienen azida, se pueden emplear descritos en mayor detalle.

Los marcadores y enlaces preferentes incluyen los descritos en WO 03/048387.

En los métodos donde se incorporan los nucleótidos, por ejemplo, donde la incorporación de una molécula de nucleótidos complementaria a los nucleótidos en un polinucleótido objetivo de cadena sencilla es controlada en una reacción de síntesis o secuenciación de la invención, la incorporación de la molécula se puede lograr a través de una transferasa terminal, una polimerasa o una transcriptasa inversa.

Preferentemente, la molécula se incorpora por una polimerasa y particularmente de *Thermococcus* sp., tal como 9°N. Aún más preferentemente, la polimerasa es un mutante 9°N A485L y aún más preferentemente es un doble mutante Y409V y A485L.

En los métodos para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla que comprende monitorear la incorporación secuencial de nucleótidos complementarios de la invención, se prefiere que el grupo de bloqueo y el marcador se puedan eliminar en una etapa única de tratamiento químico. Así, en una modalidad preferente de la invención, el grupo de bloqueo se escinde simultáneamente con el marcador. Esto, por supuesto, será una característica inherente a los grupos de bloqueo de la fórmula Z, que incorporan un marcador detectable.

Además, preferentemente las construcciones de nucleótidos bloqueados y marcados modificados de las bases de los nucleótidos A, T, C y G son reconocidos como sustratos por la misma enzima polimerasa.

En los métodos descritos en la presente, cada uno de los nucleótidos se puede poner en contacto con el objetivo secuencialmente, con la eliminación de los nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido,

donde la detección y eliminación del marcador y del grupo de bloqueo se lleva a cabo ya sea después de la adición de cada nucleótido o después de la adición de los cuatro nucleótidos.

5 En los métodos, todos los nucleótidos se pueden poner en contacto con el objetivo simultáneamente, es decir, una composición que comprende todos los diferentes nucleótidos se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo.

10 Los métodos pueden comprender una primera etapa y una segunda etapa, donde en la primera etapa, una primera composición que comprende dos de los cuatro tipos de nucleótidos modificados se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y donde en la segunda etapa, una segunda composición que comprende los dos nucleótidos no incluidos en la primera composición se ponen en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y donde las primera y segunda etapas pueden repetirse opcionalmente una o más veces.

15 Los métodos descritos en la presente también pueden comprender una primera etapa y una segunda etapa, donde en la primera etapa, una composición que comprende uno de los cuatro nucleótidos se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y donde en la segunda etapa, una segunda composición, que comprende los tres nucleótidos no incluidos en la primera composición se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y donde las primera y segunda etapas pueden repetirse opcionalmente una o más veces.

20 Los métodos descritos en la presente también pueden comprender una primera etapa y una segunda etapa, donde en la primera etapa, una primera composición que comprende tres de los cuatro nucleótidos se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo y donde en la segunda etapa, una composición que comprende el nucleótido no incluido en la primera composición se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y donde las primera y segunda etapas pueden repetirse opcionalmente una o más veces.

25 La etapa de incorporación en los métodos de la invención se puede lograr a través de una transferasa terminal, una polimerasa o una transcriptasa inversa como se definió anteriormente. El marcador detectable y/o el enlazador escindible pueden ser de un tamaño suficiente para evitar la incorporación de un segundo nucleósido o nucleótido en la molécula de ácido nucleico.

30 En determinados métodos descritos en la presente para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla, cada uno de los cuatro nucleótidos, uno de los cuales será complementario a la primera base no apareada en el polinucleótido objetivo, puede ponerse en contacto con el objetivo secuencialmente, opcionalmente con la eliminación de los nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido. La determinación del éxito de la incorporación se puede llevar a cabo o bien después de la provisión de cada nucleótido, después de la adición de todos los nucleótidos añadidos. Si se determina después de la adición de menos de cuatro nucleótidos que uno se ha incorporado, no es necesario proporcionar nucleótidos adicionales para detectar los nucleótidos complementarios al nucleótido incorporado.

35 Alternativamente, todos los nucleótidos se pueden poner en contacto con el objetivo simultáneamente, es decir, una composición que comprende todos los diferentes nucleótidos (es decir, A, T, C y G o A, U, C y G) se pone en contacto con el blanco, y los nucleótidos no incorporados eliminado antes de la detección y eliminación de marcador(es). Los métodos que implican la adición secuencial de nucleótidos pueden comprender una primera subetapa y, opcionalmente, una o más subetapas posteriores. En la primera subetapa una composición que comprende uno, dos o tres de los cuatro nucleótidos posibles se proporciona, es decir, se pone en contacto con, el objetivo. Después de eso los nucleótidos no incorporados se pueden retirar y una etapa de detección puede llevarse a cabo para determinar si uno de los nucleótidos se ha incorporado. Si uno se ha incorporado, se puede efectuar la escisión del enlazador. De esta manera se puede determinar la identidad de un nucleótido en el polinucleótido objetivo. El polinucleótido naciente se puede después
45 extender para determinar la identidad del siguiente nucleótido no apareado en el oligonucleótido objetivo.

50 Si la primera subetapa anterior no conduce a la incorporación de un nucleótido, o si no se conoce, ya que la presencia de nucleótidos incorporados no se busca inmediatamente después de la primera subetapa, se pueden realizar una o más subetapas posteriores en las que algunos o todos, de los nucleótidos no proporcionados en la primera subetapa se

- proporcionan de forma adecuada, simultánea o posteriormente. Después de eso cualquiera de los nucleótidos no incorporados se puede retirar y llevar a cabo una etapa de detección para determinar si una de las clases de nucleótidos que se ha incorporado. Si uno se ha incorporado, se puede efectuar la escisión del enlazador. De esta manera, se puede determinar la identidad de un nucleótido en el polinucleótido objetivo. El polinucleótido naciente se puede después extender para determinar la identidad del siguiente nucleótido no apareado en el oligonucleótido objetivo. Si es necesario, se puede efectuar una tercera y opcionalmente una cuarta subetapa de una manera similar a la segunda subetapa. Obviamente, una vez que cuatro subetapas se han llevado a cabo, los cuatro nucleótidos posibles se han proporcionado y uno se habrá incorporado.
- 5
- 10 Es deseable determinar si un tipo o clase de nucleótido se ha incorporado después de cualquier combinación particular que comprende uno, dos o tres nucleótidos que se han proporcionado. De esta manera el costo innecesario y el tiempo gastado en proporcionar el (los) otro(s) nucleótido(s) se obvia. Esto, sin embargo no es una característica necesaria de la invención.
- 15 También es deseable, cuando el método para la secuenciación comprende una o más subetapas, eliminar cualquiera de los nucleótidos no incorporados antes de proporcionar el nucleótido adicional. Una vez más, esto no es una característica necesaria de la invención. Obviamente, es necesario que al menos algunos y preferentemente tantos como sea posible de los nucleótidos no incorporados se eliminen antes de la detección del nucleótido incorporado.
- 20 Los kits de la invención incluyen: (a) los nucleótidos individuales de acuerdo con la invención descrita anteriormente, donde cada uno de los nucleótidos tiene una base que está unida a un marcador detectable por un enlazador escindible, o un marcador detectable unido a través de un revestimiento escindible opcionalmente a un grupo de bloqueo de la fórmula Z, y donde el marcador detectable unido a cada nucleótido se puede distinguir en la detección del marcador detectable usado para otros tres nucleótidos, y (b) los materiales de envase para ello. El kit puede incluir además una
- 25 enzima para la incorporación de los nucleótidos en la cadena de nucleótidos complementaria y tampones apropiados para la acción de la enzima, además de los productos químicos adecuados para la eliminación del grupo de bloqueo y el marcador detectable, que preferentemente se puede eliminar por la misma etapa de tratamiento químico.
- 30 Los nucleótidos/nucleósidos son adecuados para el uso en muchas diferentes metodologías basadas en el ADN, incluyendo la síntesis de ADN y los protocolos de secuenciación de ADN.
- La invención puede entenderse con referencia a los dibujos adjuntos en los que:
- 35 La Figura 1 muestra ejemplos de estructuras de nucleótidos útiles en la invención. Para cada estructura, X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato. R₁ y R₂ pueden ser los mismos o diferentes, y pueden seleccionarse de H, OH, o cualquier grupo de la reivindicación 1 que puede transformarse en un OH. Algunos grupos funcionales adecuados para R₁ y R₂ incluyen las estructuras mostradas en la Figura 3 y la Figura 4.
- La Figura 2 muestra las estructuras de enlazadores útiles en ciertos aspectos de la invención, incluyendo enlazadores de disulfuro (1) y enlazadores sensibles a ácido, (2) enlazadores de dialcoxibencilo, (3) enlazadores Sieber, (4) enlazadores
- 40 de indol y (5) enlazadores Sieber de t-butilo.
- La Figura 3 muestra algunas moléculas funcionales útiles en la invención, incluyendo algunos enlazadores escindibles y algunos grupos protectores de hidroxilo adecuados. En estas estructuras, R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes, y pueden seleccionarse de H, OH, o cualquier grupo de la reivindicación 1 que puede transformarse en un grupo OH. R₃
- 45 representa uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de grupos alquilo, alcoxilo, amino o halógeno. R₄ y R₅ pueden ser H o alquilo, y R₆ puede ser alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno o bencilo. X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato.
- La Figura 4 es una ilustración esquemática de algunos de los grupos de bloqueo Z que pueden usarse de acuerdo con ciertos aspectos de la invención.
- La Figura 5 muestra dos ciclos de incorporación de DGTP, DCTP y dATP marcados y bloqueados respectivamente
- 50 (compuestos 18, 24 y 32).
- La Figura 6 muestra seis ciclos de incorporación de DTTP marcado y bloqueado (compuesto 6).
- La Figura 7 muestra el bloqueo efectivo por el compuesto 38 (un nucleótido 3'-O alilo)
- 55 La presente descripción se refiere a moléculas de nucleótidos o nucleósidos que están modificadas por la unión covalente reversible de un grupo 3'-OH de bloqueo a la misma, y cuyas moléculas se pueden usar en las reacciones donde se requieren moléculas de nucleótido o nucleósido bloqueadas, tales como en las reacciones de secuenciación, síntesis de polinucleótidos y similares.

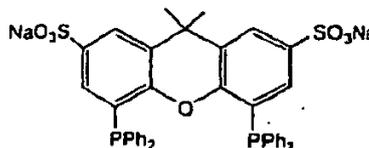
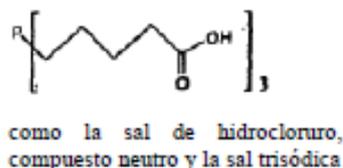
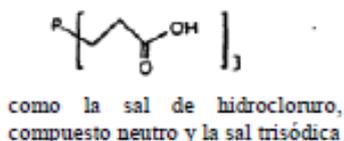
Como se usa en la presente, el término molécula biológica se usa para abarcar cualquiera de las moléculas o clase de

molécula que ejecuta un papel biológico. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, polinucleótidos tales como los oligonucleótidos de ADN y el ARN, y nucleótidos sencillos. Adicionalmente, los péptidos y los miméticos de péptidos, tales como enzimas y hormonas etc., son aceptados por la invención. Los compuestos que comprenden un enlace secundario de amida, tal como péptidos, o una amina secundaria, donde tales compuestos son aliados en el átomo de nitrógeno de la amina secundaria o la amida, son ejemplos de compuestos de fórmula R_2N (alilo) en el que ambos grupos R pertenecen a la misma molécula biológica. Particularmente, los compuestos preferidos sin embargo son los polinucleótidos, (incluyendo oligonucleótidos) y nucleótidos y nucleósidos, preferentemente aquellos que contienen una base que une un marcador detectable unido a través de un enlazador escindible. Tales compuestos son útiles en la determinación de secuencias de oligonucleótidos como se describe en la presente.

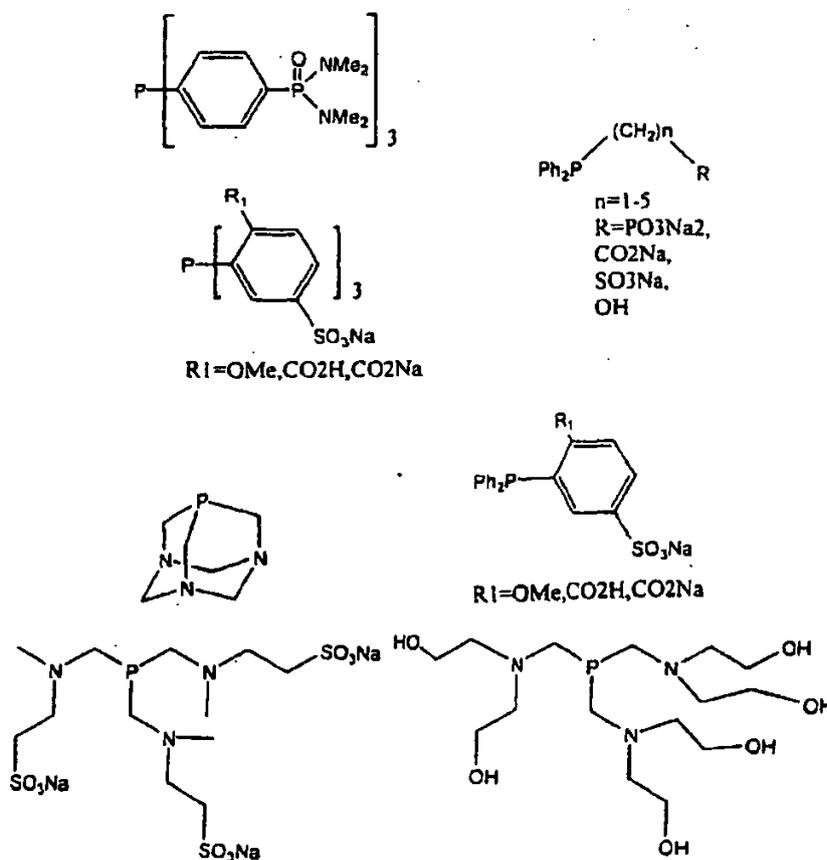
Los ligandos apropiados son cualquier fosfina o ligandos mezclados nitrógeno-fosfina conocidos por aquellos expertos en la materia, se caracterizan en que los ligandos se derivatizan para hacerlos solubles en agua, por ejemplo por la introducción de uno o más residuos sulfonato, amina, hidroxilo (preferentemente una pluralidad de hidroxils) o carboxilato. Cuando los residuos amina se presentan, la formación de sales de amina puede ayudar a la solubilización del ligando y así del complejo metal-alilo. Los ejemplos de ligandos adecuados son las triaril fosfinas, por ejemplo trifenil fosfina, derivatizados para hacerlos solubles en agua. También se prefieren las trialquil fosfinas, por ejemplo, tri-C₁₋₆-alquil fosfinas tales como trietil fosfinas; dichas trialquil fosfinas se derivatizan del mismo modo para hacerlas solubles en agua. Las fosfinas que contienen carboxilato y sulfonato son particularmente preferidas; un ejemplo de la 3,3',3''-fosfinidinatrís (ácido bencenosulfónico) que está disponible comercialmente de Aldrich Chemical Company como la sal trisódica; y un ejemplo preferente del último es la tris(2-carboxietil)fosfina que está disponible de Aldrich como la sal clorhidrato.

Las fosfinas solubles en agua y las fosfinas que contienen nitrógeno descritas en la presente se pueden usar como sus sales (por ejemplo como clorhidrato o sales de sodio) o, por ejemplo, en el caso de las fosfinas que contienen ácido sulfónico y carboxílico descritas en la presente, como los ácidos libres. Así 3,3',3''-fosfinidinatrís (ácido bencenosulfónico) y tris(2-carboxietil)fosfinas se pueden introducir tanto como los triácidos o sales trisódicas. Otras sales apropiadas serán evidentes para los expertos en la técnica. La existencia en forma de sal no es particularmente importante siempre que las fosfinas sean solubles en solución acuosa.

Otros ligandos que pueden usarse para incluir son los siguientes:



35



5

El experto en la materia será consciente de que los átomos quelados para el metal de transición en el complejo soluble en agua pueden ser parte de ligandos mono o polidentados. Algunos de tales ligandos polidentados se muestran anteriormente. Aunque se prefieren ligandos monodentados, la invención también abarca métodos que usan fosfina soluble en agua bi, tri, tetra, penta y hexadentada y ligandos de fosfina solubles en agua que contienen nitrógeno

10

El experto en la materia será capaz de determinar la cantidad de ligando que mejor se ajusta a cualquier reacción individual.

15

Donde el grupo de bloqueo es cualquiera de $\text{C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{R}'')_2$ o $\text{-C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{H})\text{R}''$, es decir de la fórmula Z, cada R' puede ser independientemente H o un alquilo

20

Los productos intermedios producidos favorablemente de manera espontánea se disocian bajo condiciones acuosas nuevamente a la estructura 3' hidroxil natural, que permite la incorporación posterior de otro nucleótido. Cualquier grupo protector adecuado puede usarse, como se discutió en la presente descripción. Preferentemente, Z es de la fórmula $\text{C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{R}'')_2$ o $\text{-C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{H})\text{R}''$.

Particularmente preferido, Z es de la fórmula, $\text{-C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{R}'')_2$. R'' R'' puede ser un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido.

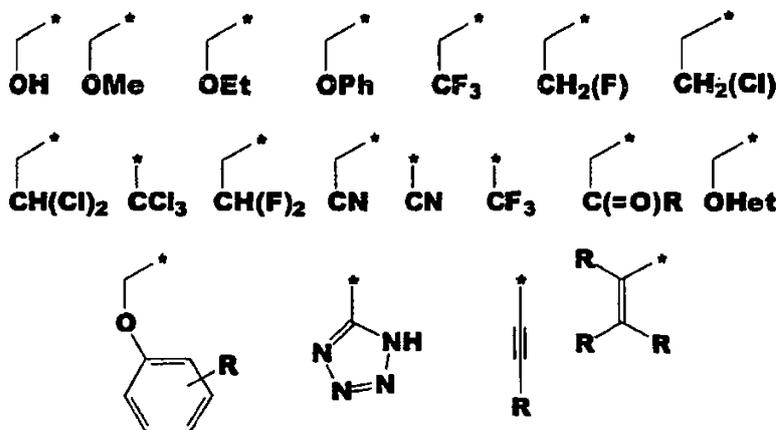
25

Un ejemplo de los grupos de estructura -O-Z en donde Z es $\text{-C}(\text{R}')_2\text{-N}(\text{R}'')_2$ son aquellos en los cuales $\text{-N}(\text{R}'')_2$ es azido (-N_3). Un ejemplo preferido es azidometilo en donde cada R' es H. Alternativamente, R' en los grupos Z de la fórmula $\text{-C}(\text{R}')_2\text{-N}_3$ y otros grupos Z puede ser cualquiera de los otros grupos mencionados en la presente.

30

Los ejemplos de grupos R' típicos incluyen C_{1-6} alquilo, particularmente metilo y etilo, y los siguientes (en el que cada estructura muestra el enlace que conecta la porción R' al átomo de carbono al que está unido en los grupos Z; el asterisco (*) indica los puntos de unión):

5



10

(en donde cada R es un grupo C₁₋₁₀ alquilo opcionalmente sustituido, un grupo alcoxi opcionalmente sustituido, un átomo de halógeno o grupo funcional tal como hidroxilo, amino, ciano, nitro, carboxilo y similares) y "Het" es un heterocíclico (el cual puede ser por ejemplo un grupo heteroarilo). Estos grupos R' mostrados anteriormente son preferidos donde el otro grupo R' es igual que el primero o es hidrógeno. Los grupos Z preferidos son de la fórmula C(R')₂N₃ en la cual los grupos R' se seleccionan de las estructuras que se dan anteriormente e hidrógeno, o en la cual (R')₂ representa un grupo alquilideno de la fórmula =C(R'')₂, por ejemplo =C(Me)₂.

15

Cuando las moléculas contienen grupos Z de fórmula C(R')₂N₃, el grupo azido se puede convertir en amino al contactar tales moléculas con la fosfina o ligandos de fosfinas que contienen nitrógeno descritos en detalle en la presente. Alternativamente, el grupo azido en los grupos Z de fórmula C(R')₂N₃ se pueden convertir en amino al contactar tales moléculas con los tioles, en particular, tioles solubles en agua tales como ditiotreititol (DTT).

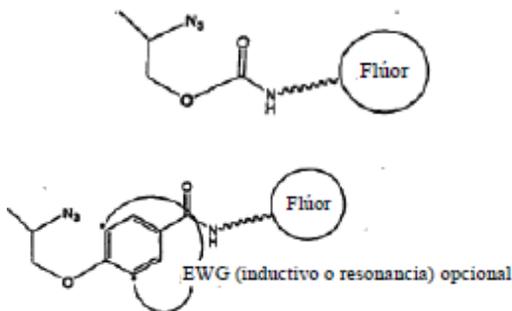
20

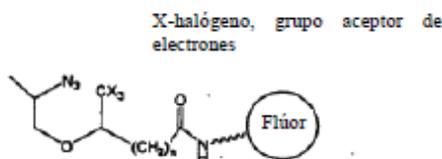
Cuando un grupo R' representa un marcador detectable unido a través de un grupo de unión, el otro grupo R' o cualquier otro componente de "Z" generalmente no contienen un marcador detectable, ni la base del nucleósido o nucleótido contiene un marcador detectable. Los grupos adecuados de enlaces para conectar el marcador detectable al grupo de bloqueo 3' serán conocido por un experto en la materia y los ejemplos de tales grupos se describen en mayor detalle en la presente.

25

Los enlaces ilustrativos en los grupos R' que contienen marcadores detectables son aquellos que contienen uno o más enlaces amida. Tales enlazadores pueden contener también un grupo arileno, por ejemplo, fenileno, en la cadena (es decir, una porción de unión Ar donde el anillo de fenilo es parte del enlazador por medio de sus átomos de carbono dispuestos 1,4). El anillo de fenilo puede ser sustituido en su posición no enlazada con uno o más sustituyentes tales como alquilo, hidroxilo, alquiloxi, haluro, nitro, carboxilo o ciano y similares, particularmente grupos aceptores de electrones, cuya acción electroaceptora es tanto por inducción como por resonancia. El enlace en el grupo R' puede incluir además las porciones tales como -O-, -S(O)_q, en donde q es 0, 1 o 2 o NH o Nalquilo. Los ejemplos de tales grupos Z son los siguientes:

35





(en donde EWG se destaca como grupo aceptor de electrones, n es un número entero del 1 al 50, preferentemente 2-20, por ejemplo, 3 a 10, y flúor indica un fluoróforo). Un ejemplo de un grupo aceptor de electrones por resonancia es el nitro, un grupo que actúa mediante inducción es el flúor. El experto en la materia será consciente de otros grupos aceptores de electrones apropiados. Adicionalmente, se entenderá que mientras un fluoróforo se indica como el marcador detectable presente, otros grupos detectables como se discute en mayor detalle más adelante se pueden incluir en su lugar.

10 Cuando un marcador detectable está unido a un nucleótido en la posición 3' de bloqueo, el enlazador no necesita ser escindible para tener utilidad en estas reacciones, tales como la secuenciación de ADN, descritas en la presente que requieren que el marcador se "lea" y se retire antes de la siguiente etapa de la reacción. Esto se debe a que el marcador, cuando se une al bloque 3', se separará del nucleótido cuando los compuestos intermedios descritos en la presente colapsen con el fin de sustituir el grupo "Z" con un átomo de hidrógeno. Como se destacó anteriormente, cada R" es, o es parte de un grupo protector removible. R" puede ser un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido es una modalidad alternativa.

20 Se apreciará que cuando sea posible incorporar un marcador detectable en un grupo R", la invención abarca esta posibilidad. Así, cuando R" es un grupo bencilo, el anillo fenilo puede llevar un grupo enlazador al que está unido un fluoróforo u otro grupo detectable. La introducción de tales grupos no impide la capacidad de eliminar tales R" y no impide la generación de los intermediarios deseados inestables durante la desprotección de los grupos de bloqueo de fórmula Z.

25 Como se conoce en la técnica, un "nucleótido" consiste de una base nitrogenada, un azúcar, y uno o más grupos fosfato. Ellos son unidades monoméricas de una secuencia de ácido nucleico. En el ARN, el azúcar es una ribosa, y en el ADN una deoxiribosa, es decir un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la ribosa. La base nitrogenada es un derivado de purina o pirimidina. Las purinas son adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas son citosina (C) y timina (T) (o en el contexto del ARN, uracilo (U)). El átomo de C-1 de la desoxiribosa está unido al N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Un nucleótido es también un éster de fosfato o un nucleósido, con esterificación que ocurre en el grupo hidroxilo unido al C-5 del azúcar. Los nucleótidos son usualmente mono, di o trifosfatos.

35 Un "nucleósido" es estructuralmente similar a un nucleótido, pero carece de las porciones fosfato. Un ejemplo de un análogo de nucleósido sería uno en el que se vincula el marcador a la base y no hay ningún grupo fosfato unido a la molécula de azúcar.

40 Aunque la base se refiere generalmente como una purina o pirimidina, el experto en la materia apreciará que los derivados y análogos están disponibles los cuales no alteran la capacidad de experimentar el apareamiento de bases de nucleótido o nucleósido de Watson-Crick. "Derivado" o "análogo" significa un compuesto o molécula cuya estructura central es la misma que, o se parece mucho a la de, un compuesto parental, pero que tiene una modificación química o física, como un grupo lateral diferente o adicional, o grupos de bloqueo 2' y/o 3', lo que permite que el derivado de nucleótido o nucleósido se enlace a otra molécula. Por ejemplo, la base puede ser una desazapurina. Los derivados deben ser capaces de experimentar apareamiento de Watson-Crick. "Derivado" y "análogo" también significa un derivado sintético de nucleótido o nucleósido que tiene porciones de base modificadas y/o porciones de azúcar modificados. Tales derivados y análogos se discuten en, por ejemplo, Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley & Son, 1980) y Uhlman y otros, Chemical Reviews 90:543-584, 1990. Los análogos de nucleótidos pueden comprender también enlaces fosfodiéster modificados, incluyendo enlaces fosforotioato, fosforoditioato, alquil-fosfonato, fosforanilidato y fosforamidato. Los análogos deben ser capaces de experimentar apareamiento de bases de Watson-Crick. "Derivado", "análogo" y "modificado" como se usa en la presente, se pueden usar indistintamente, y son abarcados por los términos "nucleótido" y "nucleósido" definidos en la presente.

50 En el contexto de la presente invención, el término "incorporar" significa formar parte de un ácido nucleico (por ejemplo el ADN) o molécula de oligonucleótido o cebador. Un oligonucleótido se refiere a una molécula sintética o natural que comprende una secuencia de nucleótidos unidos covalentemente que se forman mediante un enlace fosfodiéster o

fosfodiéster modificado entre la posición 3' de la pentosa en un nucleótido y la posición 5' de la pentosa en un nucleótido adyacente.

El término "alquilo" cubre grupos de cadena recta, cadena ramificada y cicloalquilo. A menos que el contexto lo indique de cualquier otra forma, el término "alquilo" se refiere a grupos que tienen 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo 1 a 8 átomos de carbono, y típicamente de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, ter-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil butilo, 3-metil butilo, y n-hexilo y sus isómeros.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo son aquellos que tienen de 3 a 10 átomos del anillo, los ejemplos particulares incluyen aquellos derivados de ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano y cicloheptano, bicicloheptano y decalina.

Donde los grupos alquilo (que incluye cicloalquilo) son sustituidos, particularmente donde estos forman ambos grupos R' de las moléculas de la invención, los ejemplos de los sustituyentes adecuados incluyen sustituyentes halógeno o grupos funcionales tales como hidroxilo, amino, ciano, nitro, carboxilo y similares. Tales grupos pueden ser además sustituyentes, donde sea apropiado, de los otros grupos R' en las moléculas de la invención.

El término amino se refiere a grupos del tipo NR^{*}R^{**}, en donde R^{*} y R^{**} son independientemente seleccionados de hidrógeno, un grupo C₁₋₆ alquilo (además denominado como C₁₋₆ alquilamino o di-C₁₋₆ alquilamino).

El término "halógeno" como se usa en la presente incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Las moléculas de nucleótidos de la presente invención son adecuadas para usar en muchos métodos diferentes donde se requiere la detección de nucleótidos.

Los métodos de secuenciación del ADN, tales como los esbozados en la patente de Estados Unidos núm. 5,302,509 pueden llevarse a cabo usando los nucleótidos.

La presente invención puede hacer uso de marcadores detectables convencionales. Detección puede realizarse por cualquier método adecuado, que incluyen espectroscopia de fluorescencia o por otros medios ópticos. El marcador preferido es un fluoróforo, el cual, después de la absorción de energía, emite radiación a una longitud de onda definida. Se conocen muchos marcadores fluorescentes adecuados. Por ejemplo, Welch y otros (Chem. Pat Eur. J. 5(3):951-960, 1999) describe porciones fluorescentes dansil-funcionalizadas que pueden usarse en la presente invención. Zhu y otros (Cytometry 28:206-211, 1997) describe el uso de los marcadores fluorescentes Cy3 y Cy5, los cuales pueden usarse además en la presente invención. Los marcadores adecuados para usar se describen además en Prober y otros, (Science 238:336-341, 1987); Connell y otros (BioTechniques 5(4):342-38.4, 1987), Ansorge y otros (Nucl. Acids Res. 15(11):4593-4602, 1987) y Smith y otros (Nature 321:674, 1986). Otros marcadores fluorescentes disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, la fluoresceína, rodamina (incluyendo TMR, Texas Red y Rox), alexa, bodipy, acridina, cumarina, pireno, benzantraceno y las cianinas.

Múltiples marcadores pueden usarse además en la invención. Por ejemplo, casetes FRET bi-fluoróforo (Tet. Let. 46:8867-8871, 2000) son bien conocidos en la técnica y se pueden usar en la presente invención. Los sistemas dendriméricos multi-flúor (J. Amer. Chem. Soc. 123:8101-8108, 2001) también pueden ser usados.

Aunque los marcadores fluorescentes son preferentes, otras formas de marcadores detectables serán evidentes como útiles para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, las micropartículas, que incluyen puntos cuánticos (Empodocles y otros, Nature 399:126-130, 1999), nanopartículas de oro (Reichert y otros, Anal. Chem. 72:6025-6029, 2000) y microglóbulos (Lacoste y otros, Proc. Natl. Acad. Sci USA 97(17):9461-9466, 2000) pueden ser usadas.

Los marcadores de componentes múltiples también se pueden usar en la invención. Un marcador de componentes múltiples es uno que es dependiente de la interacción con un compuesto adicional para la detección. El marcador de componentes múltiples más común que se usa en biología es el sistema biotina-estreptavidina. La biotina se usa como el marcador adherido a la base del nucleótido. La estreptavidina se añade después por separado para permitir que ocurra la detección. Otros sistemas de múltiples componentes están disponibles. Por ejemplo, el dinitrofenol tiene un anticuerpo fluorescente disponible en el mercado que se puede usar para la detección.

La invención ha sido y será descrita adicionalmente con referencia a los nucleótidos. Sin embargo, a menos que se indique lo contrario, también se pretende que la referencia a los nucleótidos sea aplicable a los nucleósidos. La invención

se describirá adicionalmente con referencia al ADN, aunque la descripción será también aplicable al ARN, ANP y otros ácidos nucleicos, a menos que se indique lo contrario.

Los nucleótidos modificados de la invención pueden usar un enlazador escindible para unir el marcador al nucleótido. El uso de un enlazador escindible asegura que el marcador puede, si es necesario, ser retirado después de la detección, evitando cualquier señal de interferencia con cualquier nucleótido marcado incorporado posteriormente.

Generalmente, el uso de enlazadores escindibles es preferente, en particular en los métodos de la invención descritos en la presente anteriormente, excepto donde el marcador detectable está unido al nucleótido formando parte del grupo "Z".

Los expertos en la técnica serán conscientes de la utilidad de los trifosfatos de didesoxinucleósido en los denominados métodos de secuenciación de Sanger y los protocolos relacionados (de tipo Sanger), que dependen de la terminación de la cadena al azar en un tipo particular de nucleótido. Un ejemplo de un protocolo de secuenciación de tipo Sanger es el método BASS descrito por Metzker (más abajo). Otros métodos de secuenciación tipo Sanger serán conocidos para los expertos en la técnica.

Los métodos de Sanger y de tipo Sanger generalmente operan por la conducción de un experimento en el que se proporcionan ocho tipos de nucleótidos, cuatro de los cuales contienen un grupo 3'OH y cuatro de los cuales omiten el grupo OH y que están marcados de manera diferente el uno del otro. Los nucleótidos usados que omiten el grupo 3'OH de dideoxi nucleótidos se abrevian convencionalmente como ddNTP. Como es conocido por el experto en la materia, ya que los ddNTP están marcados de forma diferente, mediante la determinación de las posiciones de los nucleótidos terminales incorporados y combinando esta información, se puede determinar la secuencia del oligonucleótido objetivo.

Los nucleótidos de la presente invención, será reconocida, que pueden ser de utilidad en métodos de Sanger y protocolos relacionados ya que el mismo efecto conseguido usando ddNTP puede conseguirse mediante el uso de grupos de bloqueo 3'-OH nuevos descritos en la presente: ambos evitan la incorporación de nucleótidos subsiguientes.

El uso de los nucleótidos de acuerdo con la presente invención en los métodos de secuenciación de Sanger y de tipo Sanger, en donde el enlazador que conecta el marcador detectable al nucleótido puede o no puede ser escindible, forma un aspecto adicional de la presente invención. Visto desde este aspecto, la invención proporciona el uso de tales nucleótidos en un método de secuenciación de Sanger o de tipo Sanger.

Cuando se usan los nucleótidos Z-bloqueados 3'-OH de acuerdo con la presente invención, se apreciará que los marcadores detectables unidos a los nucleótidos no necesitan estar conectados a través de enlazadores escindibles, ya que en cada caso donde un nucleótido marcado de la invención se incorpora, ningún nucleótido necesita ser posteriormente incorporado y por lo tanto el marcador no necesita ser eliminado del nucleótido.

Además, se apreciará que monitorear la incorporación de nucleótidos bloqueados 3'OH se puede determinar mediante el uso de ³²P radiactivo en los grupos fosfato unidos. Estos pueden estar presentes en cualquiera de los ddNTP por sí mismos o en los cebadores usados para la extensión. Donde los grupos de bloqueo son de la fórmula "Z", esto representa un aspecto adicional de la invención.

Visto desde este aspecto, la invención proporciona el uso de un nucleótido que tiene un grupo 3' OH bloqueado con un grupo "Z" en un método de secuenciación de de Sanger o tipo Sanger. En esta modalidad, un marcador detectable de ³²P puede estar presente en cualquiera de los ddNTP empleados en el cebador usado para la extensión.

Los enlazadores escindibles son conocidos en la técnica, y se puede aplicar la química convencional para fijar un enlazador a una base de nucleótido y un marcador. El enlazador puede ser escindido por cualquier método adecuado, incluyendo la exposición a ácidos, bases, nucleófilos, electrófilos, radicales, metales, reductores o agentes oxidantes, luz, temperatura, enzimas, etc. El enlazador tal como se discute en la presente también se puede escindir con el mismo catalizador usado para escindir el enlace del grupo de bloqueo 3'O. Los enlazadores adecuados se pueden adaptar a partir de los grupos químicos estándar de bloqueo, como se describe en Greene & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons. Los enlazadores escindibles adicionales adecuados usados en la síntesis en fase sólida se describen en Guillier y otros (Chem. Rev. 100:2092-2157, 2000).

El uso del término "enlazador escindible" no pretende implicar que se necesita que todo el enlazador sea eliminado de por ejemplo, la base del nucleótido. Cuando el marcador detectable está unido a la base, el sitio de escisión del nucleósido se puede situar en una posición en el enlazador que asegura que parte del enlazador permanece unido a la base del nucleótido después de la escisión.

5 Cuando el marcador detectable está unido a la base, el enlazador puede estar unido a cualquier posición en la base de nucleótidos siempre que el apareamiento de base de Watson-Crick aún pueda llevarse a cabo. En el contexto de las bases de purina, es preferente que el enlazador esté unido a través de la posición 7 de la purina o el análogo desazapurina preferente, a través de una purina modificada en posición 8, a través de una adenosina modificada N-6 o una guanina modificada N-2. Para las pirimidinas, la unión es preferentemente a través de la posición 5 en la citosina, la timidina o el uracilo y la posición N-4 de la citosina. Las estructuras de nucleótidos adecuados se muestran en la Figura 1. Para cada estructura en la Figura 1 X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato. R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan de H, OH, O-alilo, o la Fórmula Z como se describió en la presente o cualquier otro grupo que pueda transformarse en un OH, que incluye, pero sin limitarse a, un carbonilo, siempre que al menos uno de R₁ y R₂ sea O-alilo o la Fórmula Z como se describió en la presente. Algunos grupos funcionales adecuados para R₁ y R₂ incluyen las estructuras mostradas en las Figuras 3 y 4.

15 Los enlazadores adecuados se muestran en la Figura 3 e incluye, pero sin limitarse a, enlazadores bisulfuro (1), enlazadores sensibles a ácidos (2, 3, 4 y 5; que incluyen enlazadores de dialcoxibencilo (por ejemplo, 2), enlazadores Sieber (por ejemplo, 3), enlazadores de indol (por ejemplo, 4), enlazadores Sieber t-butilo (por ejemplo, 5)), enlazadores escindibles electrofílicamente, enlazadores escindibles nucleofílicamente, enlazadores fotoescindibles, escisión en condiciones reductoras, condiciones oxidantes, escisión mediante el uso de enlazadores de cierre de seguridad, y la escisión por mecanismos de eliminación.

20 **A. Enlazadores electrofílicamente escindibles.**

Los enlazadores electrofílicamente escindibles se escinden típicamente por protones e incluyen escisiones sensibles a los ácidos. Los enlazadores adecuados incluyen los sistemas bencílicos modificados tales como tritilo, ésteres de p-alcoxibencilo y amidas de p-alcoxibencilo. Otros enlazadores adecuados incluyen los grupos ter-butiloxicarbonilo (Boc) y el sistema acetal.

El uso de metales tiofílicos, tales como el níquel, la plata o el mercurio, en la escisión del tioacetal u otros grupos protectores que contienen azufre también se pueden considerar para la preparación de moléculas de enlace adecuadas.

30 **B. Enlazadores nucleofílicamente escindibles.**

35 La escisión nucleofílica también es un método bien reconocido en la preparación de moléculas de enlace. Los grupos tales como ésteres que son lábiles en agua (es decir, se pueden escindir simplemente a pH básico) y los grupos que son lábiles a nucleófilos no acuosos, se pueden usar. Los iones fluoruro se pueden usar para escindir enlaces silicio-oxígeno en grupos tales como silano triisopropilo (TIPS) o silano t-butildimetilo (TBDMS).

C. Enlazadores fotoescindibles.

40 Los enlazadores fotoescindibles se han usado ampliamente en la química de los carbohidratos. Se prefiere que la luz requerida para activar la escisión no afecte a los otros componentes de los nucleótidos modificados. Por ejemplo, si se usa un fluoróforo como el marcador, es preferible si este absorba luz de una longitud de onda diferente a la requerida, escindir la molécula de enlace. Los enlazadores adecuados incluyen los basados en compuestos O-nitrobencilo y compuestos nitroveratrilo. Los enlazadores basados en la química de la benzoina también se pueden usar (Lee y otros, J. Org. Chem. 64:3454-3460, 1999).

45 **D. Escisión en condiciones reductoras**

50 Hay muchos enlazadores conocidos que son susceptibles a la escisión reductora. La hidrogenación catalítica usando los catalizadores a base de paladio se han usado para escindir el bencilo y grupos benciloxicarbonilo. La reducción de enlaces disulfuro se conoce también en la técnica.

E. Escisión en condiciones oxidantes

55 Los enfoques a base de la oxidación son bien conocidos en la técnica. Estos incluyen la oxidación de grupos p-alcoxibencilo y la oxidación de los enlazadores de azufre y selenio. El uso de yodo acuoso para escindir enlazadores de disulfuros y otros a base de azufre o selenio también están dentro del alcance de la invención.

F. Enlazadores de cierre de seguridad

Los enlazadores de cierre de seguridad son aquellos que se escinden en dos etapas. En un sistema preferido, la primera etapa es la generación de un centro reactivo nucleofílico seguido por una segunda etapa que implica una ciclación intramolecular que da lugar a la escisión. Por ejemplo, los enlaces éster levulínico pueden tratarse con hidrazina o fotoquímica para liberar una amina activa, que puede ciclarse para escindir un éster en otra parte de la molécula (Burgess y otros, J. Org. Chem. 62:5165-5168, 1997).

G. Escisión por mecanismos de eliminación

Las reacciones de eliminación también se pueden usar. Por ejemplo, se puede usar la eliminación catalizada con bases de grupos tales como Fmoc y cianoetilo, y la eliminación reductora catalizada por paladio de los sistemas alílicos.

Así como el sitio de escisión, el enlazador puede comprender una unidad espaciadora. Las distancias del espaciador por ejemplo, la base del nucleótido desde el sitio de escisión o el marcador. La longitud del enlazador no es importante siempre que el marcador se mantenga a una distancia suficiente del nucleótido para no interferir con ninguna interacción entre el nucleótido y una enzima.

En una modalidad preferida, el enlazador puede constar de la misma funcionalidad que el bloqueo. Esto hará que el proceso de desprotección y desbloqueo sea más eficiente, ya que sólo un único tratamiento se requiere para eliminar el marcador y el bloqueo.

Los enlazadores particularmente preferidos son los enlazadores fosfina escindibles que contienen azida.

Un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo se puede llevar a cabo al contactar el polinucleótido objetivo separadamente con los diferentes nucleótidos para formar el complemento al del polinucleótido objetivo y detectar la incorporación de los nucleótidos. Tal método usa la polimerización, con lo que una enzima polimerasa extiende la cadena complementaria incorporando el nucleótido correcto complementario al del objetivo. La reacción de polimerización también requiere un cebador específico para iniciar la polimerización.

Para cada ciclo, la incorporación del nucleótido modificado se lleva a cabo por la enzima polimerasa, y después se determina el evento de incorporación. Existen muchas enzimas polimerasa diferentes, y será evidente para el experto en la materia cual es la más apropiada para usar. Las enzimas preferidas incluyen la ADN polimerasa I, el fragmento de Klenow, ADN polimerasa III, ADN polimerasa T4 o T7, Taq polimerasa o Vent polimerasa. Las polimerasas modificadas genéticamente para tener propiedades específicas también se pueden usar. Como se señaló anteriormente, la molécula se incorpora preferentemente por una polimerasa y particularmente de *Thermococcus sp.*, tal como 9^oN. incluso más preferentemente, la polimerasa es un mutante 9^oN A485L y aún más preferentemente es un doble mutante Y409V y A485L. Un ejemplo de una enzima preferida de este tipo es *Thermococcus sp.* 9^oN exo -Y409V A485L disponible de New England Biolabs. Los ejemplos de tales polimerasas adecuadas se describen en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996(93), págs. 5281-5285, Nucleic Acids Research, 1999(27), págs. 2454-2553 y Acids Research, 2002(30), págs. 605-613.

Los métodos de secuenciación se realizan preferentemente con el polinucleótido objetivo dispuesto en un soporte sólido. Los polinucleótidos objetivo múltiples se pueden inmovilizar sobre el soporte sólido a través de moléculas de enlace, o se puede unir a partículas, por ejemplo, microesferas, que también se pueden unir a un material de soporte sólido. Los polinucleótidos pueden unirse al soporte sólido por una serie de medios, incluyendo el uso de interacciones biotina-avidina. Los métodos para la inmovilización de polinucleótidos sobre un soporte sólido son bien conocidos en la técnica, e incluyen técnicas litográficas e "impresión" de polinucleótidos individuales en posiciones definidas sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen portaobjetos de vidrio y perlas, superficies de silicio y cerámica y materiales plásticos. El soporte es por lo general una superficie plana aunque también se pueden usar perlas microscópicas (microesferas) y pueden a su vez estar unidas a otro soporte sólido por medios conocidos. Las microesferas pueden ser de cualquier tamaño adecuado, típicamente en el intervalo de 10 nm a 100 nm de diámetro. En una modalidad preferida, los polinucleótidos se unen directamente sobre una superficie plana, preferentemente una superficie de vidrio plana. La unión será preferentemente por medio de un enlace covalente. Preferentemente, las matrices que se usan son matrices de una sola molécula que comprenden polinucleótidos en distintas áreas ópticamente resueltas, por ejemplo, como se describe en la solicitud internacional núm. WO00/06770.

El método de secuenciación se puede realizar en matrices moleculares tanto de una sola molécula de polinucleótido como múltiples polinucleótidos, es decir, matrices de distintas moléculas de polinucleótido individuales y matrices de

regiones distintas que comprenden copias múltiples de una molécula de polinucleótido individual. Las matrices de una sola molécula permiten que cada polinucleótido individual se resuelva por separado. El uso de matrices de una sola molécula es preferido. La secuenciación de matrices de una sola molécula permite que se forme una matriz espacialmente direccionable no destructiva.

5

El método hace uso de la reacción de polimerización para generar la secuencia complementaria del objetivo. Las condiciones compatibles con las reacciones de polimerización serán evidentes para las personas expertas en la materia.

10

Para llevar a cabo la reacción de la polimerasa habitualmente será necesario hibridar primero una secuencia del cebador con el polinucleótido objetivo, la secuencia del cebador que es reconocida por la enzima polimerasa y actúa como un sitio de iniciación para la extensión posterior de la cadena complementaria. La secuencia del cebador se puede añadir como un componente separado con respecto al polinucleótido objetivo. Alternativamente, el cebador y el polinucleótido objetivo pueden ser cada uno parte de una molécula de cadena sencilla, con la porción de cebador que forma un dúplex intramolecular con una parte del objetivo, es decir, una estructura de bucle en horquilla. Esta estructura se puede inmovilizar en el soporte sólido en cualquier punto de la molécula. Otras condiciones necesarias para llevar a cabo la reacción de la polimerasa, incluyendo temperatura, pH, composiciones tampón, etc., serán evidentes para los expertos en la técnica.

15

20

Los nucleótidos modificados de la invención se ponen después en contacto con el polinucleótido objetivo, para permitir que se produzca la polimerización. Los nucleótidos se pueden añadir secuencialmente, es decir, la adición separada de cada tipo de nucleótido (A, T, G o C) o añadirse conjuntamente. Si se añaden juntos, es preferente para cada tipo de nucleótidos que se marque con un marcador diferente.

25

Esta etapa de polimerización se deja proceder durante un tiempo suficiente para permitir la incorporación de un nucleótido.

30

Los nucleótidos no incorporados se eliminan a continuación, por ejemplo, sometiendo la matriz a una etapa de lavado, y después se puede llevar a cabo la detección de los marcadores incorporados.

35

La detección puede ser por medios convencionales, por ejemplo, si el marcador es una porción fluorescente, la detección de una base incorporada se puede llevar a cabo mediante el uso de un microscopio de barrido confocal para explorar la superficie de la matriz con un láser, para representar la imagen de un fluoróforo unido directamente a la base incorporada. Alternativamente, un detector 2-D sensible, tal como un detector de carga acoplado (CCD), se puede usar para visualizar las señales individuales generadas. Sin embargo, otras técnicas tales como la microscopía óptica de barrido en campo cercano (SNOM) están disponibles y se pueden usar cuando se forman las imágenes de las matrices densas. Por ejemplo, usando SNOM, los polinucleótidos individuales se pueden distinguir cuando se separan por una distancia de menos de 100 nm, por ejemplo, 10 nm a 10 μm. Para una descripción de la microscopía óptica de barrido de campo cercano, ver Moyer y otros, Laser Focus World 29:10, 1993. Un aparato adecuado usado para formar las imágenes de las matrices de polinucleótidos se conocen y la técnica de configuración será evidente para el experto en la materia.

40

45

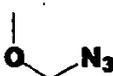
Después de la detección, el marcador se puede eliminar usando condiciones adecuadas que escinden el enlazador y el bloqueo de 3'OH para permitir la incorporación de nuevos nucleótidos modificados de la invención. Las condiciones apropiadas pueden ser las descritas en la presente para el grupo alilo y para las desprotecciones del grupo "Z". Estas condiciones pueden servir tanto para desproteger el enlazador (si es escindible) y el grupo de bloqueo. Alternativamente, el enlazador se puede desproteger por separado del grupo alilo mediante el empleo de métodos de escisión del enlazador conocidos en la técnica (que no cortan el enlace del grupo bloqueo O) seguido de la desprotección.

50

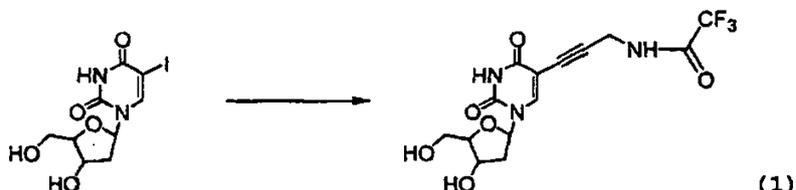
Esta invención puede entenderse adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos que sirven para ilustrar la invención y no para limitar su ámbito de aplicación.

3'-OH protegido con un grupo azidometil como una forma protegida de un hemiaminal:

55

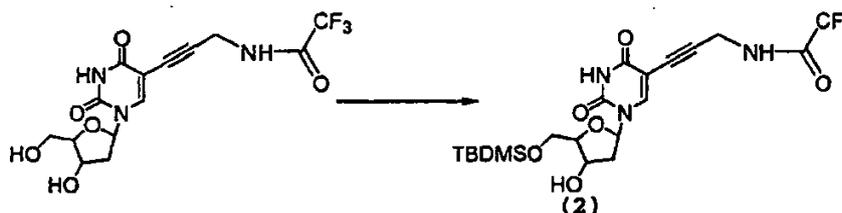


Los nucleótidos que contienen este grupo de bloqueo en la posición 3' se sintetizaron, se muestran incorporados exitosamente por las ADN polimerasas, bloquean de manera eficiente y pueden ser eliminados posteriormente en condiciones acuosas, neutras usando fosfinas o tioles solubles en agua, lo que permite la extensión adicional:



5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiuridina (1).

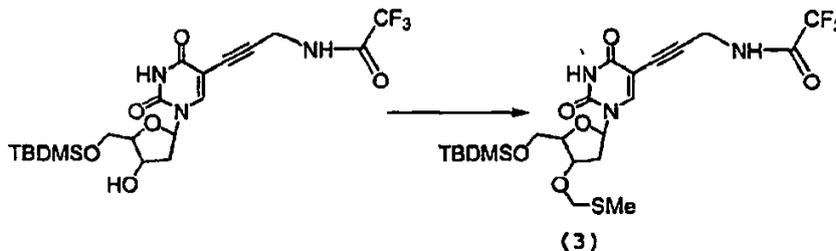
10 A una solución de 5-yodo-2'-deoxiuridina (1.05 g, 2.96 mmol) y CuI (114 mg, 0.60 mmol) en DMF seco (21 ml) se añadió trietilamina (0.9 ml). Después de agitar por 5 min se añadieron trifluoro-N-prop-2-inil-acetamida (1.35 g, 9.0 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (330 mg, 0.29 mmol) a la mezcla y la reacción se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad por 16 h. Se añadieron a la mezcla de reacción metanol (MeOH) (40 ml) y bicarbonato en dowex y se agitó por 45 min. La mezcla se filtró y el filtrado se lavó con MeOH y el disolvente se eliminó al vacío. La mezcla cruda se purificó por cromatografía en sílice (acetato de etilo (EtOAc) a EtOAc:MeOH 95:5) para dar cristales ligeramente amarillos (794 mg, 71 %). ¹H NMR (d₆ dimetilsulfóxido (DMSO)) δ 2.13-2.17 (m, 2H, H-2'), 3.57-3.65 (m, 2H, H-5'), 3.81-3.84 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.27 (m, 3H, H-3', CH₂N), 5.13 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, OH), 5.20 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, OH), 6.13 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 8.23 (s, 1H, H-6), 10.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 11.70 (br s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para CuH₁₄F₃N₃O₆ 377.08, encontrada 376.



5'-O-(ter-butildimetilsilil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiuridina (2).

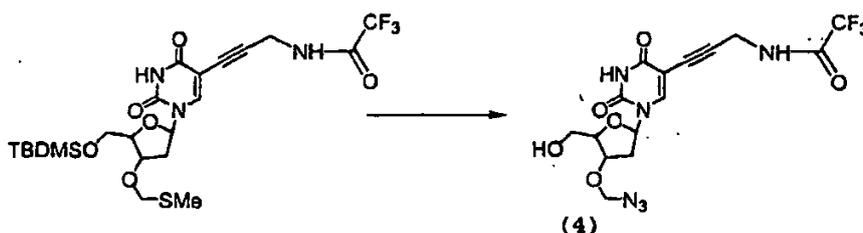
25 A una solución de (1) (656 mg, 1.74 mmol) en DMF seco (15 ml) se añadió t-butildimetilsililcloruro (288 mg, 1.91 mmol) en porciones pequeñas, seguido por imidazol (130 mg, 1.91 mmol). La reacción continuó con TLC y se completó después de agitar por 8 h a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con solución de NaCl saturada acuosa. Se añadió EtOAc (25 ml) a la mezcla de reacción y la capa acuosa se extrajo con EtOAc tres veces. Después de secar los productos orgánicos combinados (MgSO₄), el disolvente se eliminó al vacío. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc:éter de petróleo 8:2) dio (2) como cristales ligeramente amarillos (676 mg, 83 %). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 0.00

30 (s, 6H, CH₃), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.93-2.00 (m, 1H, H-2'), 2.06-2.11 (m, 1H, H-2'), 3.63-3.75 (m, 2H, H-5'), 3.79-3.80 (m, 1H, H-4'), 4.12-4.14 (m, 3H, H-3', CH₂N), 5.22 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, OH), 6.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 7.86 (s, 1H, H-6), 9.95 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 11.61 (br s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₂₀H₂₈F₃N₃O₆Si 491.17, encontrada 490.



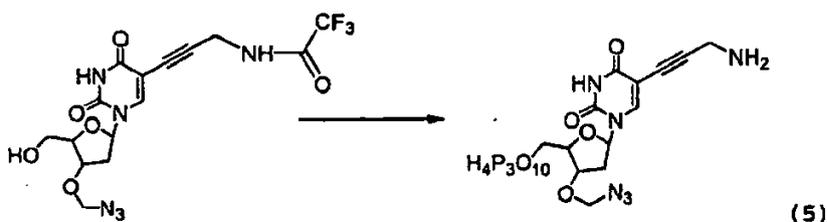
5'-O-(terc-butildimetilsilil)-3'-O-metiltiometil-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiuridina (3).

A una solución de (2) (1.84 g, 3.7 mmol) en DMSO seco (7 ml) se añadió ácido acético (3.2 ml) y anhídrido acético (10.2 ml). La mezcla se agitó por 2 días a temperatura ambiente, antes que se inactivara con NaHCO₃ saturado acuoso. Se añadió EtOAc (50 ml) y la capa acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de NaHCO₃ saturada acuosa y se secaron (MgSO₄) después de eliminar el disolvente a presión reducida, el producto (3) se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc: éter de petróleo 8:2) produciendo un aceite claro pegajoso (1.83 g, 89 %). ¹H NMR (d₆ DMSO) : δ 0.00 (s, 6H, CH₃), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.96-2.06 (m, 1H, H-2'), 1.99 (s, 3H, SCH₃), 2.20-2.26 (m, 1H, H-2'), 3.63-3.74 (m, 2H, H-5'), 3.92-3.95 (m, 1H, H-4'), 4.11-4.13 (m, 2H, CH₂), 4.28-4.30 (m, 1H, H-3'), 4.59 (br s, 2H, CH₂), 5.97 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 7.85 (s, 1H, H-6), 9.95 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₂₂H₃₂F₃N₃O₆SSi 551.17, encontrada 550.



3'-O-azidometil-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiuridina (4).

A una solución de (3) (348 mg, 0.63 mmol) y ciclohexeno (0.32 ml, 3.2 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 ml) a 4 °C, se añadió sulfonilcloruro (1M en CH₂Cl₂, 0.76 ml, 0.76 mmol) en forma de gotas bajo N₂. Después de 10 min la TLC indicó el consumo total de los nucleósidos (3). El disolvente se evaporó y el residuo se sometió a alto vacío por 20 min. Este se disolvió después nuevamente en DMF seco (3 ml) y se trató con NaN₃ (205 mg, 3.15 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente por 2h. La reacción se inactivó con CH₂Cl₂ y las capas orgánicas se lavaron con solución de NaCl saturada acuosa. Después de eliminar el solvente, la goma amarilla resultante se disolvió nuevamente en THF (2 ml) y se trató con TBAF (1 M en THF, 0.5 ml) a temperatura ambiente por 30 min. El disolvente se eliminó y la reacción se trató finalmente con CH₂Cl₂ y solución de NaHCO₃ saturada acuosa. La capa acuosa se extrajo tres veces con CH₂Cl₂. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc: éter de petróleo 1:1 a EtOAc) dio (4) (100 mg, 37 %) como una espuma amarilla pálida. ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 2.15-2.26 (m, 2H, H-2'), 3.47-3.57 (m, 2H, H-5'), 3.88-3.90 (m, 1H, H-4'), 4.14 (d, J = 4.7 Hz, 2H, CH₂NH), 4.24-4.27 (m, 1H, H-3'), 4.75 (s, 2H, CH₂N₃), 5.14 (t, J = 5.2 Hz, 1H, OH), 5.96-6.00 (m, 1H, H-1'), 8.10 (s, 1H, H-6), 10.00 (s, 1H, NHCOCF₃), 11.26 (s, 1H, NH).



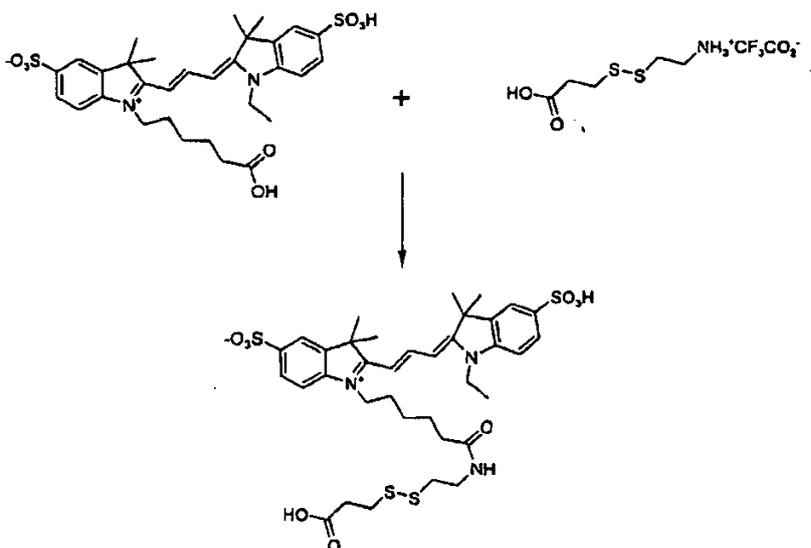
30 Preparación de bis (tri-n-butilamonio) pirofosfato (0.5 M solución en DMF)

El tetrasodio difosfato decahidratado (1.5 g, 3.4 mmol) se disolvió en agua (34 ml) y la solución se aplicó a una columna de dowex en forma de H⁺. La columna se eluyó con agua. El eluyente se goteó directamente en una solución agitada y fría (baño de hielo) de tri-n-butilamina (1.6 ml, 6.8 mmol) en EtOH (14 ml). La columna se lavó hasta que el pH del eluyente aumentó hasta 6. La solución de etanol acuosa se evaporó hasta secarse y después se co-evaporó dos veces con etanol y dos veces con DMF anhidro. El residuo se disolvió en DMF (6.7 ml). La solución de color amarillo pálido se almacenó sobre tamices moleculares de 4Å.

40 3'-O-azidometil-5-(3-amino-prop-1-inil)-2'-deoxiuridina 5'-O-nucleósido trifosfato (5).

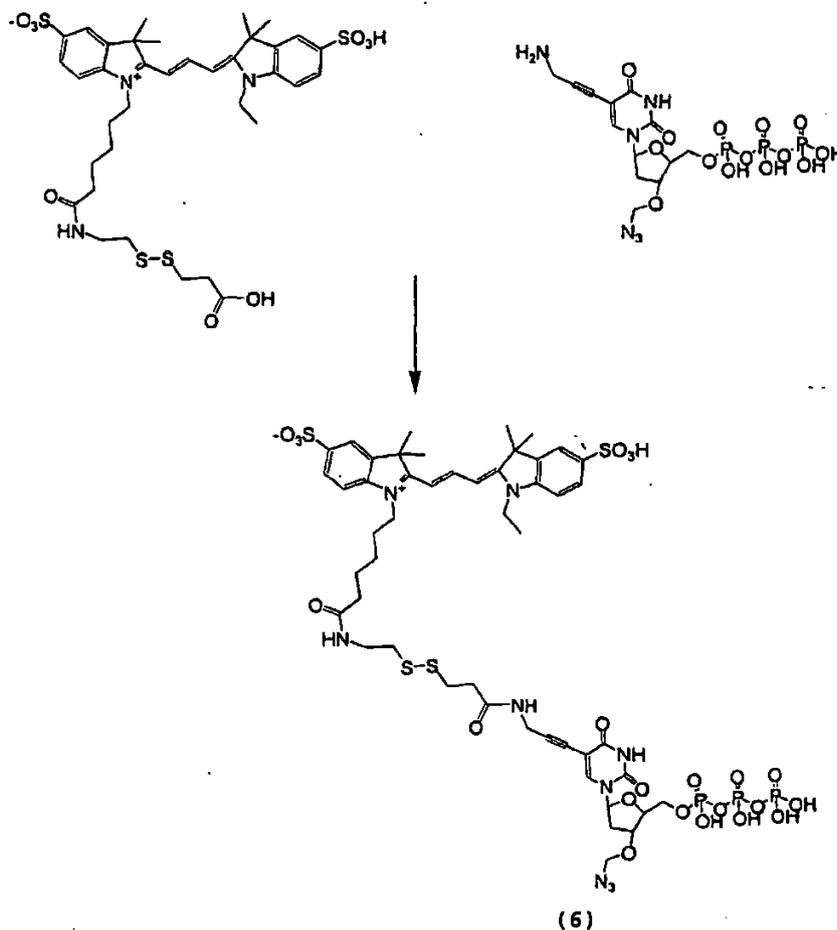
El nucleósido (4) y la esponja de protones se secó sobre P₂O₅ al vacío durante la noche. Una solución de (4) (92 mg, 0.21 mmol) y esponja de protones (90 mg, 0.42 mmol) en trimetilfosfato (0.5 ml) se agitó con tamices moleculares de 4Å por 1 h. Se añadió POCl₃ recientemente destilado (24 µl, 0.26 mmol) y la solución se agitó a 4°C por 2h. La mezcla se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente y se añadieron el bis (tri-n-butil amonio) pirofosfato (1.7 ml, 0.85 mmol) y tri-n-butil amina anhidra (0.4 ml, 1.7 mmol). Después de 3 min, la reacción se inactivó con tampón TEAB

(trietilamonio bicarbonato) 0.1 M (15 ml) y se agitó por 3h. El agua se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en amoníaco concentrado (p 0.88, 15 ml) y se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó después hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y la solución se aplicó a una columna DEAE-Sephadex A-25. Se realizó la MPLC con un gradiente lineal de TEAB. El trifosfato se eluyó en tampón entre 0.7 M y 0.8 M. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y se evaporaron hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y se purificó adicionalmente por HPLC. HPLC: $t_r(5)$: 18.8 min (columna preparativa Zorbax C18, gradiente: 5% a 35% B en 30 min, tampón A de TEAB0.1M, tampón B MeCN). El producto se aisló como una espuma blanca (76 O.D., 7.6 μmol , 3.8%, $\epsilon_{280} = 10000$). $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 1.79 (s, CH_2), 2.23-2.30; 2.44-2.50 (2 x m, 2H, H-2'), 3.85 (m, CH_2NH), 4.10-4.18 (m, 2H, H-5'), 4.27 (br s, H-4'), 4.48-4.50 (m, H-3'), 4.70-4.77 (m, CH_2N_3), 6.21 (t, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 8.32 (s, 1H, H-6). $^{31}\text{P NMR}$ (D_2O) δ -6.6 (m, 1P, P_γ), -10.3 (d, $J = 18.4$ Hz, 1P, P_α), -21.1 (m, 1P, P_β). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_3$ 576.02, encontrada 575.

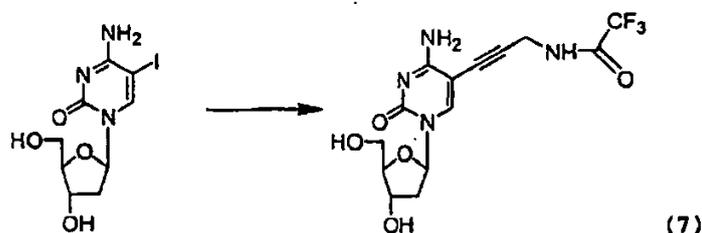


15 Enlazador Cy-3disulfuro.

El disulfuro de partida (4.0 mg, 13.1 μmol) se disolvió en DMF (300 μl) y se añadió lentamente diisopropiletamina (4 μl). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se añadió una solución del colorante Cy-3 (5 mg, 6.53 μmol) en DMF (300 μl) durante 10 min. Después de 3.5 h, con la reacción completa, los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo crudo se purificó por HPLC en una columna analítica Zorbax SB-C18 con un régimen de flujo de 1ml/min en tampón de trietilamonio bicarbonato 0.1M (tampón A) y CH_3CN (tampón B) usando el siguiente gradiente: 5 min B al 2% ; 31min B al 55% ; 33 min B al 95% ; 37 min al 95%; 39 min B al 2% ; 44 min. B al 2%. El enlazador Cy3-disulfuro esperado se eluyó con a t_r : 21.8 min. con 70% de rendimiento (basado en una medición UV; $\epsilon_{550} 150,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en H_2O) como un sólido higroscópico. $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 1.31-1.20 (m + t, $J = 7.2$ Hz, 5H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 1.56-1.47 (m, 2H, CH_2), 1.67 (s, 12H, 4 CH_3), 1.79-1.74 (m, 2H, CH_2), 2.11 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2), 2.37 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2), 2.60 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2), 2.67 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2), 3.27 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2), 4.10-4.00 (m, 4H, 2 CH_2), 6.29 (dd, $J = 13.1$, 8.1 Hz, 2H, 2 =CH), 7.29 (dd, 2H, $J = 8.4$, 6.1 Hz, 2 =CH), 7.75-7.71 (m, 2H, 2 =CH), 7.78 (s, 2H, =CH), 8.42 (t, $J = 12.8$ Hz, 1H, =CH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}_4$ 793.22, encontrada 792 (M-H), 396 [M/2]

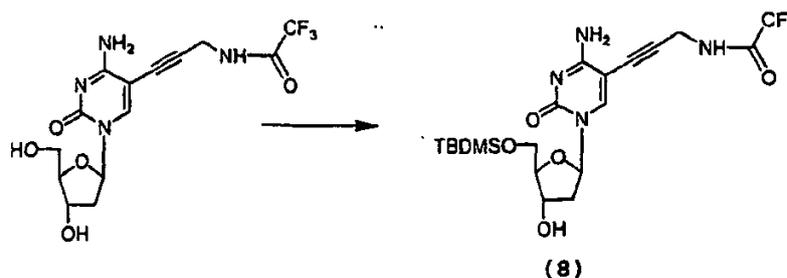


- 5 Una mezcla del enlazador de disulfuro Cy3 (2.5 μmol), disuccinimidil carbonato (0.96 mg, 3.75 μmol) y DMAP (0.46 mg, 3.75 μmol) se disolvieron en DMF seco (0.5 ml) y se agitó a temperatura ambiente por 10 min. La reacción se monitoreó por TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 3:7) hasta que el enlazador colorante se consumió. Después, una solución de (5) (7.5 μmol) y *n*-BU₃N (30 μl , 125 μmol) en DMF (0.2 ml) se añadió a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente por 1 h. La TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 4:6) mostró el consumo completo del éster activado y una mancha roja oscura apareció en la línea base. La reacción se inactivó con TEAB tampón (0.1M, 10 ml) y se cargó en una columna DEAE Sephadex (2 x 5 cm). La columna se eluyó primero con tampón TEAB 0.1 M (100 ml) para lavar los residuos orgánicos y después tampón TEAB 1 M (100 ml). El análogo de trifosfato deseado (6) se eluyó con tampón TEAB 1 M. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se evaporaron y se purificaron por HPLC. Condiciones de la HPLC: *t_r*(6): 16.1 min (columna preparativa Zorbax C18, gradiente: 2% B al 55% en 30 min, tampón A TEAB 0.1M, tampón B MeCN). El producto se aisló como un sólido rojo oscuro (1.35 μmol , 54%, ϵ_{550} = 150000). ¹H NMR (D₂O) δ 1.17-1.28 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.41-1.48 (m, 3 H, CH₃), 1.64 (s, 12H, 4 x CH₃), 1.68-1.71 (m, 2H, CH₂), 2.07-2.10 (m, 3H, H-2', CH₂), 2.31-2.35 (m, 1H, H-2'), 2.50-2.54 (m, 2H, CH₂), 2.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 2.76 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.26-3.31 (m, 2H, CH₂), 3.88-3.91 (m, 2H CH₂), 3.94-4.06 (m, 3H, CH₂N, H-5'), 4.16 (br s, 1H, H-4'), 4.42-4.43 (m, 1H, H-3'), 4.72-4.78 (m, 2H, CH₂N₃), 6.24 (dd, *J* = 5.8, 8.2 Hz, H-1'), 6.25 (dd, *J* = 3.5, 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.24, 7.25 (2d, *J* = 14.8 Hz, 2 x =CH), 7.69-7.86 (m, 4H, H_{Ar}, H-6), 8.42 (t, *J* = 13.4 Hz, =CH). ³¹P NMR (D₂O) δ -4.85 (m, 1P, P_γ), -9.86 (m, 1P, P_α), -20.40 (m, 1P, P_β). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₄₉H₆₄N₉O₂₂P₃S₄ 1351.23, encontrada 1372 (M-2H+Na), 1270 [M-80], 1190 [M-160]
- 10
- 15
- 20



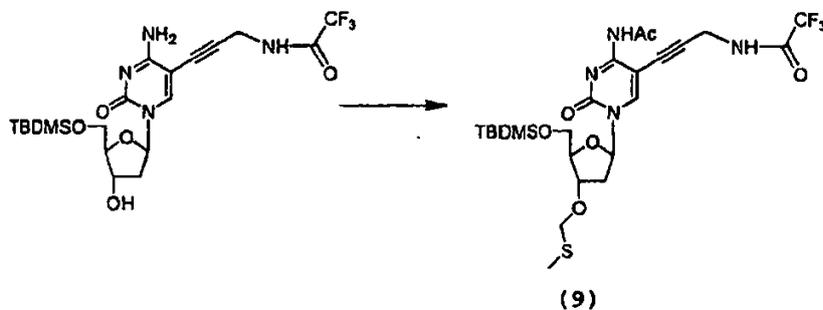
5 **5-[3-(2,2,2-Trifluoroacetamido)-prop-1-ynil]-2'-deoxycitidina (7).**

A una solución de 5-yodo-2'-deoxicitidina (10 g, 28.32 mmol) en DMF (200 ml) en un matraz de fondo redondo protegido de la luz bajo una atmósfera de argón, se añadió CuI (1.08 g, 5.67 mmol), trietilamina (7.80 ml, 55.60 mmol), 2,2,2-trifluoro-*N*-prop-2-inil-acetamida (12.8 g, 84.76 mmol) y al final Pd(PPh)₃₄ (3.27 g, 2.83 mmol). Después de 18 horas a temperatura ambiente, se añadió bicarbonato en dowex (20 mg) y la mezcla se agitó por 1 h adicional. La filtración y evaporación de los volátiles a presión reducida dio un residuo que se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:EtOAc 1:1, EtOAc:MeOH 9:1). El producto esperado (7) se obtuvo como un sólido beige con rendimiento cuantitativo. ¹H NMR (D₂O) δ 2.24-2.17 (m, 1H, H-2'), 2.41-2.37 (m, 1H, H-2'), 3.68 (dd, *J* = 12.5, 5.0 Hz, 1H, H-5'), 3.77 (dd, *J* = 12.5, 3.2 Hz, 1H, H-5'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.27 (s, 2H, CH₂N), 4.34 (m, 1H, H-3'), 6.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 8.1 (br s, 1H, NH); MS (ES) : *m/z* (%) (M-H) 375 (100).



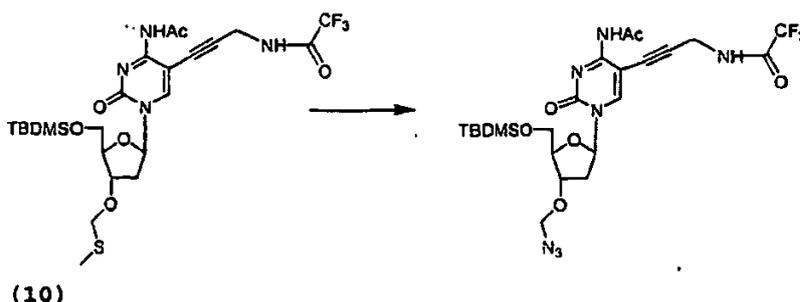
15 **5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-ynil]-2'-deoxycitidina (8).**

20 A una solución del material de partida (7) (1.0 g, 2.66 mmol) e imidazol (200 mg, 2.93 mmol) en DMF (3.0 ml) a 0 °C, se añadió lentamente TBDMSO (442 mg, 2.93 mmol) en cuatro porciones durante 1 h. Después de 2 h, los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó por cromatografía rápida (EtOAc, EtOAc:MeOH 9.5:0.5). El producto esperado (8) se aisló como un sólido cristalino (826 mg, 64%). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 0.00 (s, 1H, CH₃); 0.01 (s, 1H, CH₃), 0.79 (s, 9 H, *t*Bu), 1.87-1.80 (m, 1H, H-2'), 2.12 (ddd, *J* = 13.0, 5.8 and 3.0 Hz, 1H, H-2'), 3.65 (dd, *J* = 11.5, 2.9 Hz, 1H, H-5'), 3.74 (dd, *J* = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-5'), 3.81-3.80 (m, 1H, H-4'), 4.10-4.09 (m, 1H, H-3'), 4.17 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, NCH₂), 5.19 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, 3'-OH), 6.04 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 6.83 (br s, 1H, NHH), 7.78 (br s, 1H, NHH), 7.90 (s, 1H, H-6), 9.86 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, -H₂CNH); MS (ES) : *m/z* (%) (MH)⁺ 491 (40%).



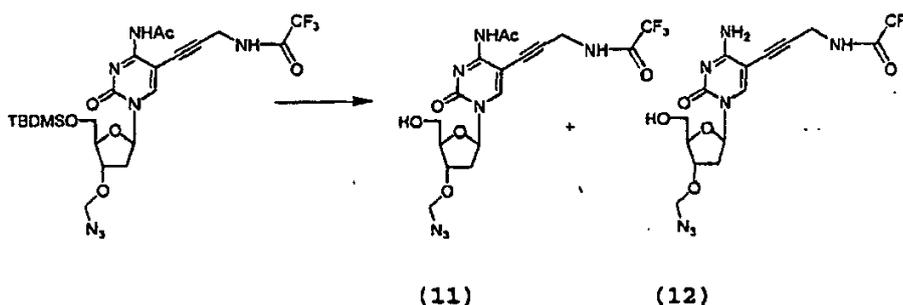
25 **4-*N*-Acetil-5'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3'-O-(metiltiolmetil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-ynil]-2'-deoxycitidina (9).**

5 A una solución del material de partida (8) (825 mg, 1.68 mmol) en DMSO (6.3 ml) y atmósfera de N₂, se añadió lentamente ácido acético (AcOH) (1.3 ml, 23.60 mmol) seguido por anhídrido acético (AC₂O) (4.8 ml, 50.50 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente por 18 h y se inactivó a 0 °C por la adición de NaHCO₃ saturado (20 ml). El producto se extrajo en EtOAc (3 x 30 ml), los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y los volátiles se evaporaron. El residuo crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc: éter de petróleo 1:1) para dar el producto esperado como un aceite incoloro (9) (573 mg, 62%). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 0.00 (s, 6H, 2 x CH₃), 0.78 (s, 9H, tBu), 2.01 (s, 3H, SCH₃), 2.19-1.97 (m, 2H, 2 x H_{2'}), 2.25 (s, 3H, COCH₃), 3.67 (dd, 1H, J = 11.5 Hz, H-5'), 3.78 (dd, 1H, J = 11.5, 3.3 Hz, H-5'), 4.06-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.17 (d, 2H, J = 5.1 Hz, N-CH₂), 4.30-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.63 (s, 2H; CH₂-S), 5.94 (t, 1H, J = 6.5 Hz, H-1'), 8.17 (s, 1H, H-6), 9.32 (s, 1H, NHCO), 9.91 (t, 1H, J = 5.4 Hz, NHCH₂); MS (ES): m/z (%) (MH)⁺ 593.



15 **4-N-Acetil-3'-O-(azidometil)-5'-O-(terc-butildimetileilil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (10).**

20 A una solución del material de partida (9) (470 mg, 0.85 mmol) en diclorometano (DCM) (8 ml) bajo una atmósfera de N₂ y enfriada hasta 0 °C, se añadió ciclohexeno (430 μl, 4.27 mmol) seguido por SO₂Cl₂ (1 M en DCM, 1.0 ml, 1.02 mmol). La solución se agitó por 30 minutos a 0 °C, y los volátiles se evaporaron. El residuo se disolvió inmediatamente en DMF (8 ml), se agitó bajo N₂ y se añadió lentamente azida de sodio (275 mg, 4.27 mmol). Después de 18 h, el producto crudo se evaporó hasta secarse, se disolvió en EtOAc (30 ml) y se lavó con Na₂CO₃ (3 x 5 ml). La capa orgánica combinada se mantuvo separada. Una segunda extracción del producto de la capa acuosa se realizó con DCM (3 x 10 ml). Todas las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y los volátiles se evaporaron a presión reducida para dar un aceite identificado como el producto esperado (10) (471 mg, 94 % de rendimiento). Este se usó sin ninguna purificación adicional. ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.88 (s, 9H, t_{Bu}), 2.16-2.25 (m, 1H, H-2'), 2.35 (s, 3H, COCH₃), 2.47-2.58 (m, 1H, H-2'), 3.79 (dd, J = 11.6, 3.2 Hz, 1H, H-5'), 3.90 (dd, J = 11.6, 3.0 Hz, 1H, H-5'), 4.17-4.19 (m, 1H, H-4'), 4.28 (s, 2H, NCH₂), 4.32-4.35 (m, 1H, H-3'), 4.89 (dd, J = 14.4, 6.0 Hz, 2H, CH₂-N₃), 6.05 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 8.25 (s, 1H, H-6), 9.46 (br s, 1H, NHH), 10.01 (br s, 1H, NHH).

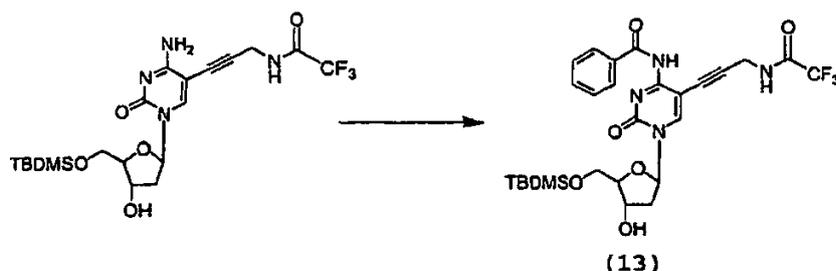


30 **4-N-Acetil-3'-O-(azidometil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina y 3'-O-(azidometil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (11).**

35 A una solución del material de partida (11) (440 mg, 0.75 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C y atmósfera de N₂, se añadió TBAF en THF 1.0 M (0.82 ml, 0.82 mmol). Después de 1.5 h, los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (EtOAc:éter de petróleo 8:2 a EtOAc 100 % a EtOAc:MeOH 8:2). Los dos compuestos se aislaron e identificaron como se describió anteriormente. El primer 4-N-acetilo (11) eluyó, (53 mg, 15 %) y el segundo 4-NH₂ (12) (271 mg, 84 %). El compuesto 4-N-Acetil (11): ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 1.98 (s, 3H, CH₃CO),

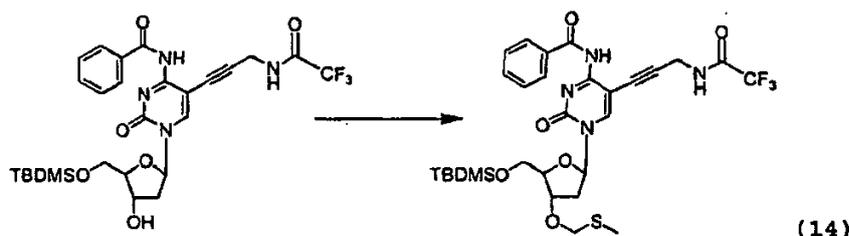
2.14-2.20 (m, 2H, $HH-2'$), 3.48-3.55 (m, 1H, H-5'), 3.57-3.63 (m, 1H, H-5'), 3.96-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.19 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2-NH), 4.23-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.77 (s, 2H, CH_2-N_3), 5.2 (t, 1H, $J = 5.1$ Hz, 5'-OH), 5.95 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-1'), 8.43 (s, 1H, H-6), 9.34 (s, 1H, CONH), 9.95 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, $NHCH_2$).

5 El compuesto 4-NH₂ (12): ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 1.98-2.07(2H, $CHH-2'$), 3.50-3.63 (m, 2H, $CHH-5'$), 3.96-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.09 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2-NH), 4.24-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH_2-N_3), 5.13 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, 5'-OH), 5.91 (br s, 1H, NHH), 6.11 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 8.20 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, NCH_2), 8.45 (s, 1H, H-6), 11.04 (br s, 1H, NRH).



10 **4-N-Henzoil-5'-O-(terc-butildimetilsilil)-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (13).**

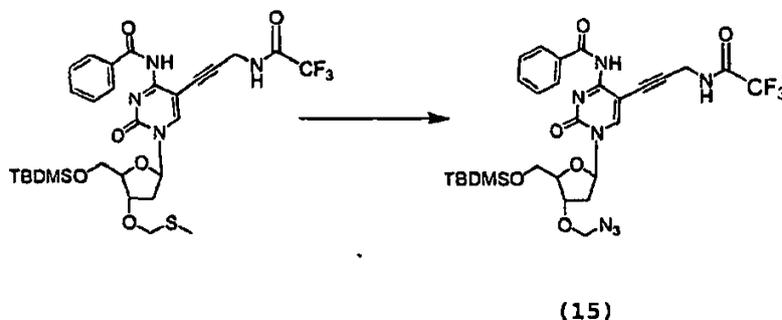
15 El material de partida (8) (10g, 20.43 mmol) se azeotropizó en piridina seca (2 x 100 ml), después se disolvió en piridina seca (160 ml) bajo una atmósfera de N₂. Se añadió clorotrimetilsilano (10 ml, 79.07 mmol) en forma de gotas a la solución y se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió después cloruro de benzoilo (2.6 ml, 22.40 mmol) a la solución y se agitó por una hora adicional. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, se añadió agua destilada (50 ml) lentamente a la solución y se agitó por 30 minutos. Se evaporaron la piridina y el agua de la mezcla bajo alto vacío para producir un gel marrón que se particionó entre 100 ml de una solución de NaHCO₃ saturada acuosa y DCM (100 ml). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con (2 x 100 ml) adicionales de DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y los volátiles se evaporaron a presión reducida. El aceite marrón resultante se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (DCM:MeOH 99:1 a 95:5) para producir un sólido cristalino amarillo claro (13) (8.92 g, 74%). ¹H NMR (d₆ DMSO): δ 0.00 (s, 6H, CH₃), 0.78 (s, 9H, tBu), 1.94 (m, 1H, H-2'), 2.27 (m, 1H, H-2'), 3.64 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, H-5'), 3.91 (m, 1H, H-4'), 4.09 (br m, 3H, CH_2NH , H-3'), 5.24 (s, 1H, 3'-OH), 6.00 (m, 1H, H-1'), 7.39 (m, 2H, Ph), 7.52 (m, 2H, Ph), 7.86 (m, 1H, Ph), 8.0 (s, 1H, H-6), 9.79 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, $NHCH_2$), 12.67 (br s, 1H, NH). La masa (electronebulización positiva) calcul. para C₂₇H₃₃F₃N₄O₆Si 594.67, encontrada 595.



30 **4-N-Benzoil-5'-O-(terc-butildimetilsilil)-3'-O-metiltiometil-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (14).**

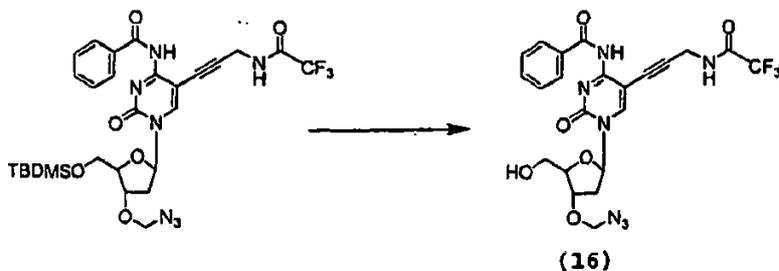
35 El material de partida (13) (2.85 g, 4.79 mmol) se disolvió en DMSO seco (40 ml) bajo una atmósfera de N₂. Se añadieron ácido acético (2.7 ml, 47.9 mmol) y anhídrido acético (14.4 ml, 143.7 mmol) secuencialmente y lentamente al material de partida, el cual se agitó después por 18 h a temperatura ambiente. Una solución de NaHCO₃ saturada (150 ml) se añadió cuidadosamente a la mezcla de reacción. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron para producir un líquido naranja que se azeotropizó posteriormente con tolueno (4 x 150 ml) hasta que el material se solidificó. El residuo crudo se purificó en gel de sílice (éter de petróleo:EtOAc 2:1 a 3:1) para producir un sólido cristalino amarillo (14) (1.58 g, 50%). ¹H NMR (d₆ DMSO): δ 0.00 (s, 6H, CH₃), 0.78 (s, 9H, tBu), 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.09 (m, 1H, H-2'), 2.28 (m, 1H, H-2'), 3.66 (d, 1H, $J = 11.5, 2.9$ Hz, H-5'), 3.74 (dd, 1H, $J = 11.3, 2.9$ Hz, H-5'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.09 (m, 1H, CH_2NH), 4.29 (m, 1H, H-3'), 4.61 (s, 2H, CH_2S), 6.00 (m, 1H, H-1'), 7.37 (m, 2H, Ph), 7.50 (m, 2H, Ph), 7.80 (d, 1H, $J = 7.55$ Hz, H_{Ar}), 7.97 (s, 1H, H-6),

9.79 (br t, 1H, $NHCH_2$), 12.64 (br s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $C_{29}H_{37}F_3N_4O_6SSi$ 654.79, encontrada 653.2.



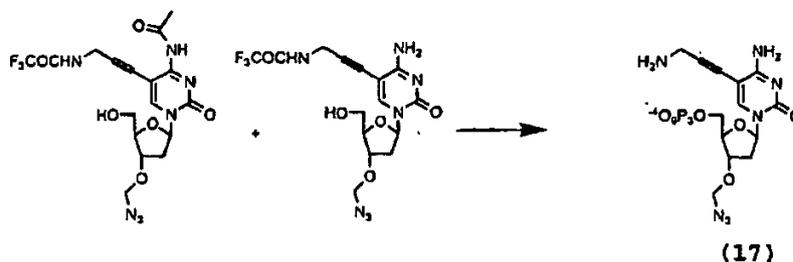
5 **4-N-Benzoil-5'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3'-O-azidometil-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (15).**

10 El material de partida **(14)** (1.65 g, 2.99 mmol) se disolvió en DCM (18 ml) y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron ciclohexeno (1.5 ml, 14.95 mmol) y SO_2Cl_2 (0.72 ml, 8.97 mmol) y se agitaron 1 h en un baño de hielo. La TLC indicó que todavía está presente material de partida con lo cual se añadió una alícuota adicional de SO_2Cl_2 (0.24 ml) y la mezcla se agitó por 1 h a 0°C. Los volátiles se eliminaron por evaporación para producir un sólido marrón claro que se disolvió nuevamente en 18 ml de DMF seco (18 ml) bajo N_2 . Se añadió azida de sodio (0.97 g, 14.95 mmol) después a la solución y se agitó por 2.5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se pasó a través de una almohadilla de sílice y se eluyó con EtOAc y los volátiles se eliminaron por evaporación a alto vacío. El gel marrón resultante se purificó por cromatografía rápida (éter de petróleo:EtOAc 2:1 a 4:1) para producir el producto deseado como un sólido cristalino blanco **(15)** (0.9 g, 55%). 1H NMR (d_6 DMSO): δ 0.00 (s, 6H, CH_3), 0.78 (s, 9H, tBu), 2.16 (m, 1H, H-2'), 2.22 (m, 1H, H-2'), 3.70 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, H-5'), 4.01 (m, 1H, H-4'), 4.10 (m, 1H, CH_2NH), 4.23 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH_2S), 5.99 (m, 1H, H-1'), 7.37 (m, 2H, Ph), 7.50 (m, 2H, Ph), 7.81 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ph), 7.95 (s, 1H, H-6), 9.78 (br s, 1H, $NHCH_2$), 12.64 (br s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $C_{28}H_{34}F_3N_7O_6Si$ 649.71, encontrada 648.2



25 **4-N-Benzoil-3'-O-azidometil-5-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxicidina (16).**

30 El material de partida **(15)** (140 mg, 0.22 mmol) se disolvió en THF (7.5 ml). Se añadió TBAF (1M sol. en THF, 0.25 ml) lentamente y se agitó por 2 h a temperatura ambiente. El material volátil se eliminó a presión reducida para producir un gel marrón que se purificó por cromatografía rápida (EtOAc:DCM 7:3) para producir el producto deseado **(16)** como un sólido cristalino de color claro (0.9 g, 76%). 1H NMR (d_6 DMSO): δ 2.16 (m, 1H, H-2'), 2.22 (m, 1H, H-2'), 3.70 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, H-5'), 4.01 (m, 1H, H-4'), 4.10 (m, 1H, CH_2NH), 4.23 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH_2S), 5.32 (s, 1H, 5' OH), 5.99 (m, 1H, H-1'), 7.37 (m, 2H, Ph), 7.50 (m, 2H, Ph), 7.81 (d, 1H, $J = 7.35$ Hz, Ph), 7.95 (s, 1H, H-6), 9.78 (br s, 1H, $NHCH_2$), 12.64 (br s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $C_{22}H_{20}F_3N_7O_6$ 535.44, encontrada 534.



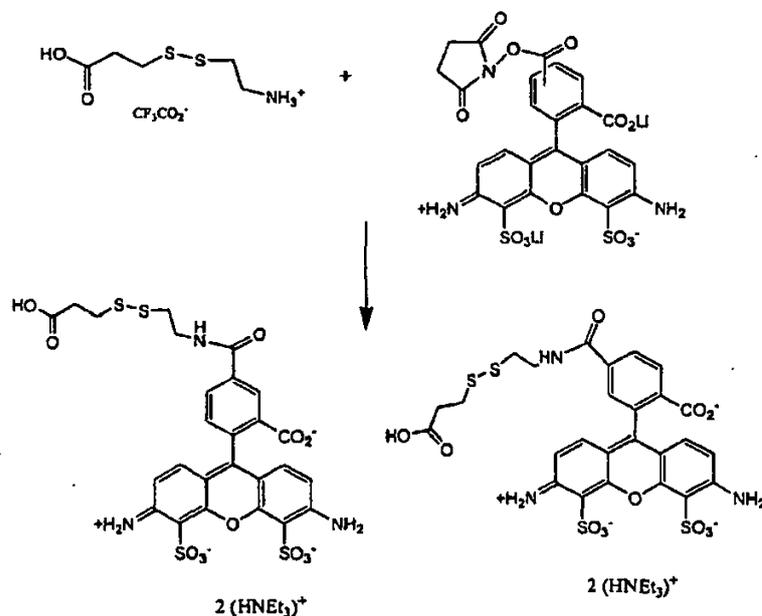
5-(3-Amino-prop-1-inil)-3'-O-azidometil-2'-deoxicitidina 5'-O-nucleósido trifosfato (17).

5 A una solución de (11) y (12) (290 mg, 0.67 mmol) y esponja de protones (175 mg, 0.82 mmol) (ambos secados previamente bajo P_2O_5 por al menos 24 h) en $PO(OMe)_3$ (600 μ l), a 0 °C bajo una atmósfera de argón, se añadió lentamente $POCl_3$ (destilado recientemente) (82 μ l, 0.88 mmol). La solución se agitó vigorosamente por 3 h a 0 °C y después se inactivó por la adición de tetra-tributilamonio difosfato (0.5 M) en DMF (5.2 ml, 2.60 mmol), seguido por

10 nBu_3N (1.23 ml, 5.20 mmol) y trietilamonio bicarbonato (TEAB) 0.1 M (20 ml). Después de 1 h a temperatura ambiente, se añadió a la mezcla una solución de amoníaco acuosa (p 0.88, 20 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente por 15 h, los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo se purificó por MPLC con un gradiente de TEAB de 0.05M a 0.7M. El trifosfato esperado se eluyó de la columna a aprox. TEAB 0.60 M. Se realizó una segunda purificación por HPLC en una columna Zorbax SB-C18 (21.2 mm i.d. x 25 cm) eluida con TEAB 0.1M (bomba A) y 30% CH_3CN en

15 TEAB 0.1M (bomba B) usando un gradiente como sigue: B al 5% 0-5 min, 0.2 ml; B al 80% 5-25 min, 0.8 ml; B al 95 % 25-27 min, 0.8 ml; B al 95 % 27-30 min, 0.8 ml; B al 5 % 30-32 min, 0.8 ml; B al 95 % 32-35 min, 0.2 ml, proporcionando el producto descrito anteriormente con un $r_f(17)$: 20.8 (14.5 μ moles, 2.5% de rendimiento); ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ -5.59 (d, J = 20.1 Hz, P_α), -10.25 (d, J = 19.3 Hz, 1P, P_α), -20.96 (t, J = 19.5 Hz, 1P, P_β); 1H NMR (D_2O) δ 2.47-2.54 (m, 1H, H-2'), 2.20-2.27 (m, 1H, H-2'), 3.88 (s, 2H, CH_2N), 4.04-4.12 (m, 1H, RH-5'), 4.16-4.22 (m, 1H, HH-5'), 4.24-4.30 (m, 1H, H-4'), 4.44-4.48 (m, 1H, H-3'), 6.13 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 8.35 (s, 1H, H-6); MS (ES): m/z (%) (M-H) 574 (73%), 494 (100 %).

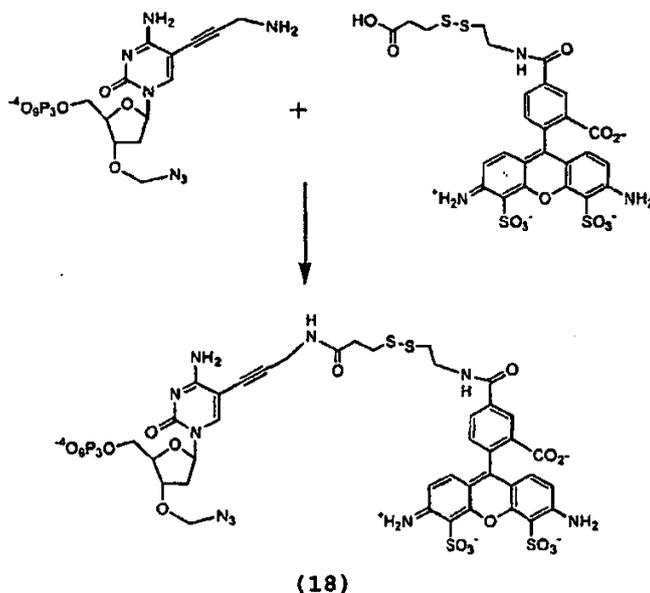
20



25 Enlazador de disulfuro Alexa488.

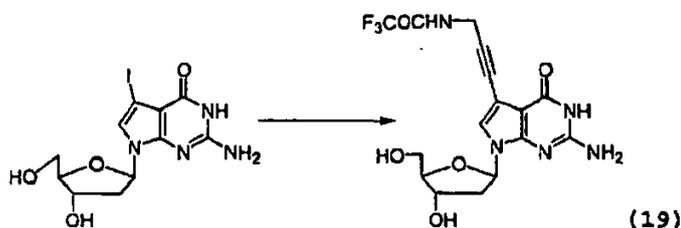
Se disolvió Alexa Fluor 488-NHS comercialmente disponible (35 mg, 54 μ mol) en DMF (700 μ l) y, para garantizar una completa activación, se añadieron secuencialmente 4-DMAP (7 mg, 59 μ mol) y N,N' -disuccinimidil carbonato (15 mg, 59 μ mol). Después de 15 min en activación completa, se añadió una solución del disulfuro de partida (32.0 mg, 108 μ mol)

en DMF (300 μ l) conteniendo diisopropiletilamina (4 μ l) sobre la solución del colorante activado. Se realizó otra adición de diisopropiletilamina (20 μ l) a la mezcla final, se ultrasonicó por 5 min y reaccionó por 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo crudo se purificó primero pasándolo a través de una columna corta de resina de intercambio de iones Sephadex -DEAE A-25 (40-120 μ), eluida primero con TEAB 0.1 M (25 ml), y después TEAB 1.0M (75 ml). La última que contenía los dos compuestos finales se concentró y el residuo se purificó por HPLC en una columna Zorbax SB-C18 (21.2 mm i.d. x 25 cm) eluida con TEAB 0.1M (bomba A) y CH₃CN (bomba B) usando un gradiente como sigue: B al 2% 0-2 min, 0.2 ml; B al 2% 2-4 min, 0.8 ml; B al 23 % 4-15 min, 0.8 ml; B al 23 % 15-24 min, 0.8 ml; B al 95 % 24-26 min, 0.8 ml; B al 95 % 26-28 min, 0.8 ml, B al 2 % 28-30 min, 0.8 ml, B al 2 % 30-33 min, 0.2 ml proporcionando los dos compuestos detallados anteriormente con t_r : 19.0 (regioisómero izquierdo) y t_r : 19.5 (regioisómero derecho). Los dos regioisómeros se pasaron respectivamente a través de una columna de resina dowex de intercambio de iones, proporcionando 16.2 μ mol y 10.0 μ mol respectivamente, 62% de rendimiento total (basado en Alexa Fluor 488-NHS comercialmente disponible de 76% de pureza); $\epsilon_{493} = 71,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en H₂O. ¹H NMR (D₂O) (regioisómero izquierdo) δ 2.51 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.66 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.71 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 3.43 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 6.64 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.77 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.46 (s, 1H, H_{Ar}), 7.90 (dd, $J = 8.1$ and 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_{Ar}). ¹H NMR (D₂O) (regioisómero derecho) δ 2.67 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.82 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.93 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.68 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 6.72 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.90 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{Ar}), 8.03 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, H_{Ar}), 8.50 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H_{Ar}). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₂₆H₂₃N₃O₁₂S₄ 697.02, encontrada 692 (M-H), 347 [M/2].



A una solución de enlazador de disulfuro de Alexa Fluor 488 (3.4 μ mol, 2.37mg) en DMF (200 μ l) se añadieron 4-DMAP (0.75 mg, 5.1 μ mol) y *N,N*-disuccinimidil carbonato (1.70 mg, 5.1 μ mol). La mezcla se agitó por 15 para una completa activación del ácido, después se añadió a una solución del nucleótido (**17**) (3.45 mg, 6.0 μ mol) en DMF (0.3 ml) que contenía *n*Bu₃N (40 μ l) a 0 °C. La mezcla se sonicó por 3 min y después se agitó continuamente por 16 h en ausencia de luz. Los volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo se purificó primero por filtración a través de una columna corta de resina de intercambio de iones Sephadex -DEAE A-25, primero eluida con TEAB 0.1 M (50 ml) eliminando el colorante-enlazador sin reaccionar, después TEAB 1.0 M (100 ml) para recoger el producto esperado (**18**). Después de la concentración el residuo se purificó por HPLC en una columna Zorbax SB-C18 (21.2 mm i.d. x 25 cm) eluida con TEAB 0.1M (bomba A) y CH₃CN (bomba B) usando un gradiente como sigue: B al 2% 0-2 min, 0.2 ml; B al 2% 2-4 min, 0.8 ml; B al 23 % 4-15 min, 0.8 ml; B al 23 % 15-24 min, 0.8 ml; B al 95 % 24-26 min, 0.8 ml; B al 95 % 26-28 min, 0.8 ml, B al 2 % 28-30 min, 0.8 ml, B al 2 % 30-33 min, 0.2 ml proporcionando el producto detallado anteriormente con t_r (**18**): 19.8 (0.26 μ moles, 12% de rendimiento basado en una medición UV); $\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ nm}$, $\epsilon = 71,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en H₂O); ³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) δ -5.06 (d, $J = 20.6$ Hz, 1P, P _{α}), -10.25 (d, $J = 19.3$ Hz, 1P, P _{β}), -21.21 (t, $J = 19.5$ Hz, 1P, P _{γ}); ¹H NMR (D₂O) δ 2.09-2.17 (m, 1H, HH-2'), 2.43-2.50 (m, 1H, HH-2'), 2.61 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₂C-S), 2.83 (2H, S-CH₂), 3.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, ArCONCH₂), 4.06 (s, 2H, CH₂N), 4.08-4.17 (m, 4H, HH-5'), 4.25-4.29 (m, 1H, H-4'), 4.46-4.50 (m, 1H, H-3'), 6.09 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 6.88 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_{Ar}), 6.89 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.15 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H,

H_{Ar}), 7.17 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.64 (br s, 1H, H_{Ar}), 8.00-7.94 (m, 2H, H_{Ar}), 8.04 (s, 1H, H-6); MS (ES): *m/z* (%) (M-H) 1253 (46%), (M-H+ Na)⁻ 1275 (100 %).

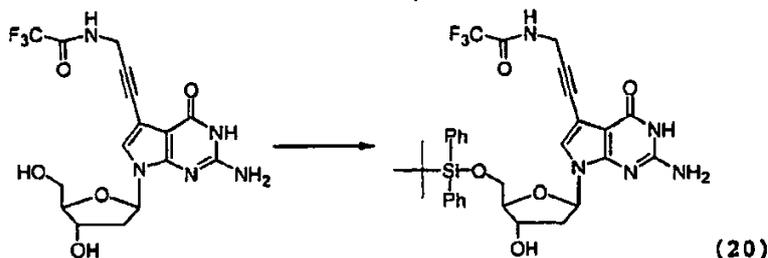


5

7-Deaza-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-enil]-2'-deoxiguanosina (19).

Se agitó en N₂, una suspensión de 7-deaza-7-yodo-guanosina (2 g, 2.75 mmol), Pd(PPh₃)₄ (582 mg, 0.55 mmol), CuI (210 mg, 1.1 mmol), Et₃N (1.52 ml, 11 mmol) y la propagilamina (2.5 g, 16.5 mmol) en DMF (40 ml) a temperatura ambiente por 15 h bajo N₂. La reacción se protegió de la luz con una lámina de aluminio. Después de la TLC indicando el consumo total del material de partida, la mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con MeOH (20 ml) y se trató con dowex-HCO₃⁻. La mezcla se agitó por 30 min y se filtró. La solución se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo:EtOAc 50:50 a éter de petróleo: EtOAc:MeOH 40: 40: 20), dando (19) como un polvo amarillo (2.1 g, 92%). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 2.07-2.11 (m, 1H, H-2'), 2.31-2.33 (m, 1H, H-2'), 3.49-3.53 (m, 2H, H-5'), 3.77 (br s, 1H, H-4'), 4.25 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ≡CCH₂), 4.30 (br s, 1H, H-3'), 4.95 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, 5'-OH), 5.25 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, 3'-OH), 6.27-6.31 (m, 1H, H-1'), 6.37 (s, 2H, NH₂), 7.31 (s, 1H, H-8), 10.10 (br s, 1H, NHCOCF₃), 10.55 (s, 1H, NH). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₁₆H₁₆F₃N₅O₅ 415, encontrada 414.

15

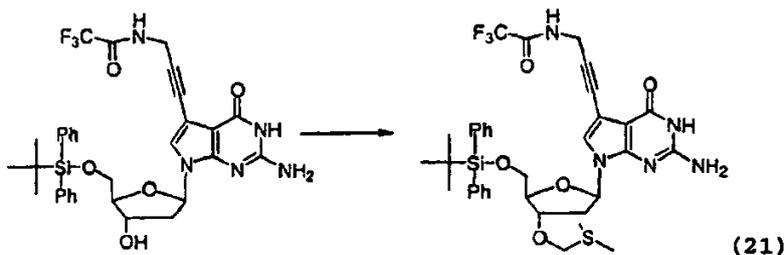


20

5'-O-(*tert*-Butildifenil)-7-deaza-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-enil]-2'-deoxiguanosina (20).

Una solución de (19) (2.4 g, 5.8 mmol) en piridina (50 ml) se trató con cloruro de *tert*-butildifenilsililo (TBDPSCI) (1.65 ml, 6.3 mmol) en forma de gotas a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó después hasta la temperatura ambiente. Después de 4h, se añadió otra porción de TBDPSCI (260 μl, 1 mmol). La reacción se monitoreó por TLC, hasta el consumo total del material de partida. La reacción se inactivó con MeOH (-5 ml) y se evaporó hasta secarse. El residuo se disolvió en DCM y se añadió NaHCO₃ saturado acuoso. La capa acuosa fue extraída con DCM tres veces. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc a EtOAc:MeOH 85:15) dio (20) una espuma amarilla (3.1 g, 82%). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 1.07 (s, 9H, CH₃), 2.19-2.23 (m, 1H, H-2'), 2.38-2.43 (m, 1H, H-2'), 3.73-3.93 (m, 2H, H-5'), 4.29 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂N), 4.42-4.43 (m, 1H, H-3'), 5.41 (br s, 1H, OH), 6.37 (t, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 6.45 (br s, 2H, NH₂), 7.24-7.71 (m, 11H, H-8, H_{Ar}), 10.12 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H, NH), 10.62 (s, 1H, H-3). Masa (electronebulización positiva) calcul. para C₃₂H₃₄F₃N₅O₅Si 653, encontrada 654.

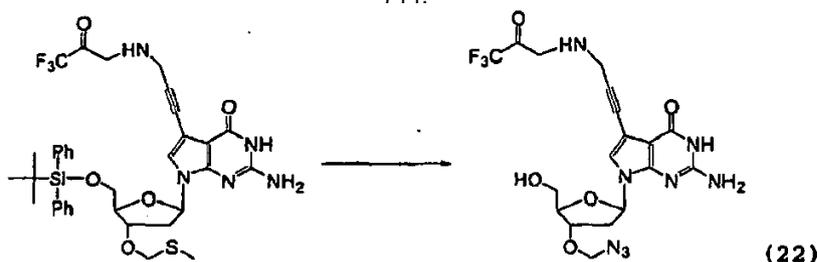
30



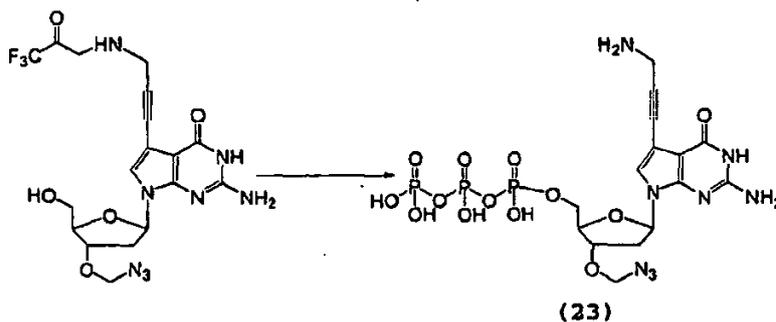
(21)

5'-O-(*tert*-Butildifenil)-7-deaza-3'-O-metilolmetil-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiguanosina (21).

Una solución de **(20)** (1.97 g, 3.0 mmol) en DMSO (15 ml) se trató con Ac₂O (8.5 ml, 90 mmol), y AcOH (2.4 ml, 42 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 15 h, después 2 h a 40°C. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (200 ml) y se agitó con NaHCO₃ saturado acuoso (200 ml) por 1 h. La capa acuosa se lavó con EtOAc dos veces. La capa orgánica se combinó, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc:Hexano 1:1 a EtOAc:Hexano:MeOH 10:10:1) dio **(21)** como una espuma amarilla (1.3 g, 60%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.04 (s, 9H, CH₃), 2.08 (s, 3H, SCH₃), 2.19-2.35 (m, 2H, H-2), 3.67-3.71 (m, 2H, H-5'), 3.97-3.99 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.23 (br s, 2H, CH₂N), 4.58 (s, 2H; CH₂S), 6.31 (dd, *J* = 5.7, 7.9 Hz, H-1'), 7.19-7.62 (m, 11H, H₈, H_Ar). Masa (electronebulización positiva) calcul. para C₃₄H₃₈F₃N₅O₅SSi 713, encontrada: 714.

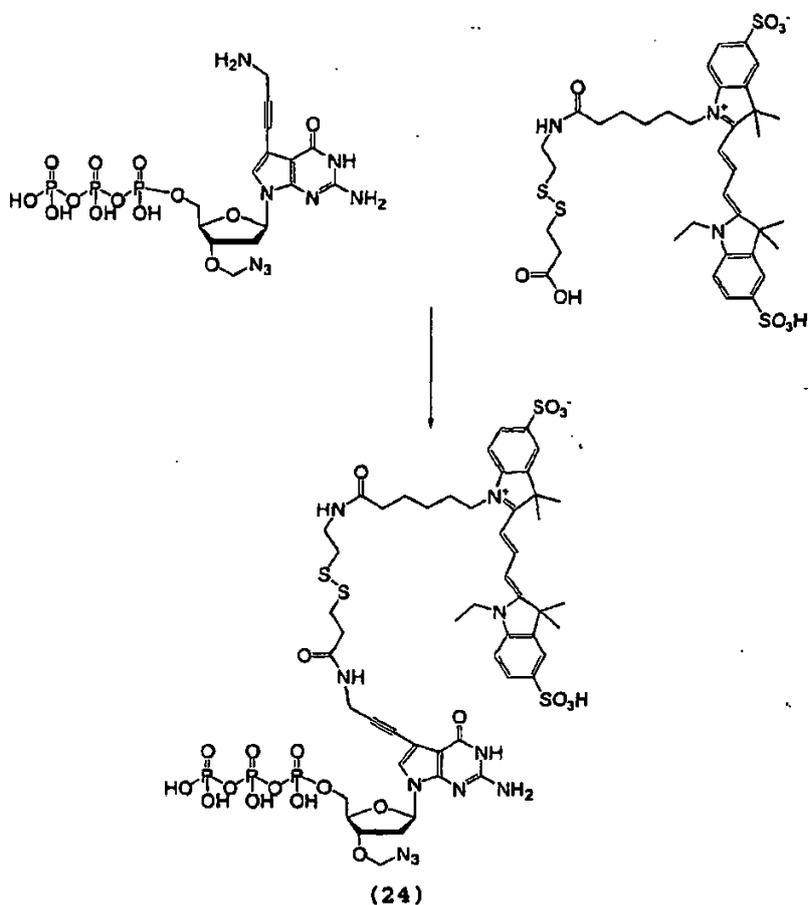
**3'-O-Azidometil-7-deaza-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiguanosina (22).**

A una solución de **(21)** (1.3 mg, 1.8 mmol), se añadió ciclohexeno (0.91 ml, 9 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) a 4 °C, sulfurilcloruro (1M en CH₂Cl₂) (1.1 ml, 1.1 mmol) en forma de gotas bajo N₂. Después de 30 min., la TLC indicó el consumo total de los nucleósidos **(22)**. Después de la evaporación para eliminar el solvente, el residuo se sometió después a alto vacío por 20 min, y después se trató con NaN₃ (585 mmol, 9 mmol) y DMF (10 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente por 2h. La extracción con CH₂Cl₂/NaCl (10%) dio una goma amarilla, la cual se trató con TBAF en THF (1 M, 3 ml) y THF (3 ml) a temperatura ambiente por 20 min. La evaporación para eliminar solventes, la extracción con EtOAc/NaHCO₃saturado acuoso, seguido por la purificación por cromatografía en sílice (EtOAc a EtOAc:MeOH 9:1) dio **(22)** como una espuma amarilla (420 mg, 50%). ¹H NMR (d₆ DMSO): δ 2.36-2.42 (m, 1H, H-2'), 2.49-2.55 (m, 1H, H-2'), 3.57-3.59 (m, 2H, H-5'), 3.97-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.29 (m, 2H, CH₂N), 4.46-4.48 (m, 1H, H-3'), 4.92-4.96 (m, 2H, CH₂N₃), 5.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH), 5.96-6.00 (dd, *J* = 5.7, 8.7 Hz, 1H, H-1'), 6.46 (br s, 2H, NH₂), 7.39 (s, 1H, H-6), 10.14 (s, 1H, NH), 10.63 (s, 1H, H-3).

**3'-O-Azidometil-7-deaza-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiguanosina 5'-O-nucleósido trifosfato (23).**

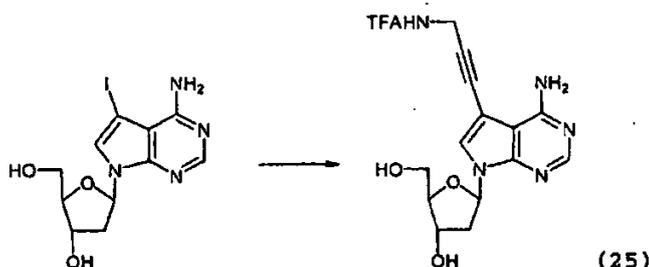
Tetrasodio difosfato decahidratado (1.5 g, 3.4 mmol) se disolvió en agua (34 ml) y la solución se aplicó a una columna de dowex 50 en forma de H⁺. La columna se lavó con agua. El eluyente se goteó directamente en una solución agitada y fría (baño de hielo) de tri-*n*-butil amina (1.6 ml, 6.8 mmol) en EtOH (14 ml). La columna se lavó hasta que el pH del eluyente aumentó hasta 6. La solución de etanol acuosa se evaporó hasta secarse y después se coevaporó dos veces con etanol y dos veces con DMF anhidro. El residuo se disolvió en DMF (6.7 ml). La solución de color amarillo pálido se almacenó sobre tamices moleculares de 4Å. El nucleósido **(22)** y la esponja de protones se secaron sobre P₂O₅ al vacío

durante la noche. Una solución de **(22)** (104 mg, 0.22 mmol) y la esponja de protones (71 mg, 0.33 mmol) en trimetilfosfato (0.4 ml) se agitaron con tamices moleculares de 4Å por 1 h. El POCl_3 recientemente destilado (25 μl , 0.26 mmol) se añadió y la solución se agitó a 4°C por 2h. La mezcla se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente y se añadieron bis (tri-*n*-butil amonio) pirofosfato (1.76 ml, 0.88 mmol) y tri-*n*-butil amina anhidra (0.42 ml, 1.76 mmol). Después de 5 min, la reacción se inactivó con tampón TEAB (triethylamonio bicarbonato) 0.1 M (15 ml) y se agitó por 3 h. El agua se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en amoniaco concentrado (p 0.88, 10 ml) y se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó después hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y la solución se aplicó a una columna DEAE-Sephadex A-25. Se realizó la MPLC con un gradiente lineal de 2 l de TEAB cada uno de 0.05 M y 1 M. El trifosfato se eluyó con tampón entre 0.7 M y 0.8 M. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y se evaporaron hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y se purificó adicionalmente por HPLC. $t_r(23) = 20.5$ min (columna preparativa Zorbax C18, gradiente: B al 5% a 35% en 30 min, tampón A TEAB 0.1M, tampón B MeCN). El producto se aisló como una espuma blanca (225 O.D., 29.6 μmol , 13.4%, $\epsilon_{260} = 7,600$). ^1H NMR (D_2O) δ 2.43-2.5 (m, 2H, H-2'), 3.85 (m, 2H, CH_2N), 3.97-4.07 (m, 2H, H-5'), 4.25 (br s, 1H, H-4'), 4.57 (br s, 1H, H-3'), 4.74-4.78 (m, 2H, CH_2N_3), 6.26-6.29 (m, 1H, H-1'), 7.41 (s, 1H, H-8). ^{31}P -NMR (D_2O) δ -8.6 (m, 1P, P_γ), -10.1 (d, $J = 19.4$ Hz, 1P, P_α), -21.8 (t, $J = 19.4$ Hz, 1P, P_β). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{P}_3$ 614, encontrada 613.



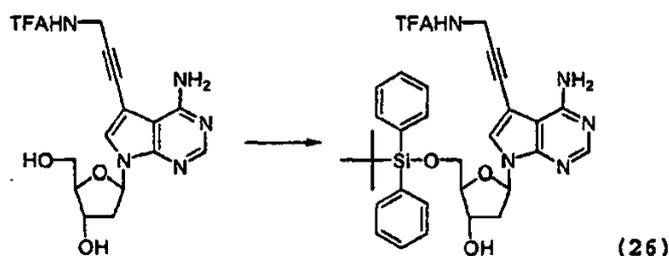
Una mezcla de Cy3 enlazado con disulfuro (2.5 μmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (0.95 mg, 5 μmol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.68 mg, 5 μmol) y *N*-metil-morfolina (0.55 μl , 5 μmol) en DMF (0.9 ml) se agitó a temperatura ambiente por 1 h. Una solución de (23) (44 O.D., 3.75 μmol) en 0.1 ml de agua se añadió a la mezcla de reacción a 4°C, y se dejó a temperatura ambiente por 3 h. La reacción se inactivó con tampón TEAB (0.1M, 10 ml) y se cargó en una columna DEAE Sephadex (2 x 5 cm). La columna se eluyó primero con tampón TEAB 0.1 M (100 ml) y después tampón TEAB 1 M (100 ml). El producto de trifosfato deseado se eluyó con tampón TEAB 1 M. Se concentró la fracción que contenía el producto y se aplicó a HPLC. $t_r(24) = 23.8$ min (columna Zorbax C18 preparativa,

gradiente: B al 5% a 55% en 30 min, tampón A TEAB 0.1M, tampón B MeCN). El producto se aisló como una espuma roja (0.5 μ mol, 20%, ϵ_{\max} = 150,000). ^1H NMR (D_2O) δ 1.17-1.71 (m, 20H, 4 x CH_2 , 4 x CH_3), . 2.07-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.21-2.30 (m, 1H, H-2'), 2.52-2.58 (m, 2H, CH_2), 2.66-2.68 (m, 2H, CH_2), 2.72-2.76 (m, 2H, CH_2), 3.08-3.19 (m, 2H, CH_2), 3.81-3.93 (m, 6H, CH_2 , H-5'), 4.08-4.16 (m, 1H, H-4'), 4.45-4.47 (m, 1H, H-3'), 4.70-4.79 (m, 2H, CH_2N_3), 6.05-6.08 (m, 2H, H_{Ar}), 6.15-6.18 (m, 1H, H-1'), 7.11 (s, 1H, H-8), 7.09-7.18 (m, 2H, CH), 7.63-7.72 (m, 4H, H_{Ar}), 8.27-8.29 (m, 1H, CH). ^{31}P NMR (D_2O) δ -4.7 (m, 1P, P_γ), -9.8 (m, 1P, P_α), -19.7 (m, 1P, P_β). Masa (electronebulización negativa) calcul. para $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{N}_{11}\text{O}_{21}\text{P}_3\text{S}_4$ 1389.25, encontrada 1388 (M-H), 694 [M-2H], 462 [M-3H].



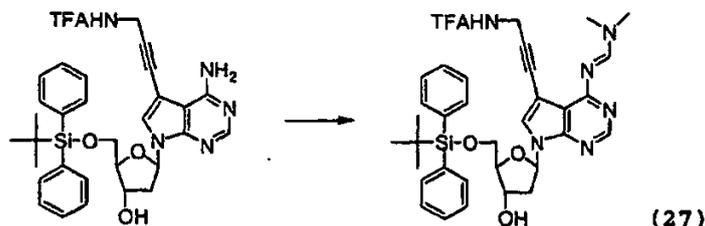
7-Deaza-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxyadenosina (25).

A una suspensión de 7-deaza-7-yodo-2'-deoxyadenosina (1 g, 2.65 mmol) y CuI (100 mg, 0.53 mmol) en DMF seco (20 ml) se añadió trietilamina (740 μ l, 5.3 mmol). Después de agitar por 5 min, se añadieron trifluoro-N-prop-2-inil-acetamida (1.2 g, 7.95 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (308 mg, 0.26 mmol) a la mezcla y la reacción se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad por 16 h. Se añadieron MeOH (40 ml) y bicarbonato en dowex a la mezcla de reacción y se agitó por 45 min. La mezcla se filtró. El filtrado se lavó con MeOH y el disolvente se eliminó al vacío. La mezcla cruda se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc to EtOAc: MeOH 95:20) para dar un polvo ligeramente amarillo (25) (1.0 g, 95 %). ^1H NMR (d_6 DMSO) δ 2.11-2.19 (m, 1H, H-2'), 2.40-2.46 (m, 1H, H-2'), 3.44-3.58 (m, 2H, H-5'), 3.80 (m, 1H, H-4'), 4.29 (m, 3H, H-3', CH_2N), 5.07 (t, J = 5.5 Hz, 1H, OH), 5.26 (d, J = 4.0 Hz, 1H, OH), 6.45 (dd, J = 6.1, 8.1 Hz, 1H, H-1'), 7.74 (s, 1H, H-8), 8.09 (s, 1H, H-2), 10.09 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH).

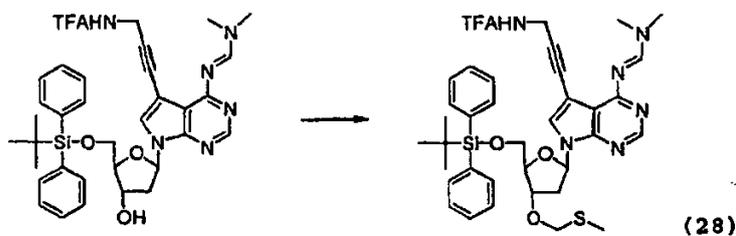


5'-O-(*tert*-Butildifenilsilil)-7-deaza-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxyadenosina (26).

El nucleósido (25) (1.13 g, 2.82 mmol) se co-evaporó dos veces en piridina seca (2 x 10ml) y se disolvió en piridina seca (18 ml). A esta solución se añadió cloruro de *t*-butildifenilsililo (748 μ l, 2.87 mmol) en porciones pequeñas a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se dejó agitar durante la noche. La reacción se inactivó con solución de NaCl saturada acuosa. Se añadió EtOAc (25 ml) a la mezcla de reacción y la capa acuosa se extrajo con EtOAc tres veces. Después de secar los extractos orgánicos combinados (MgSO_4) el disolvente se eliminó al vacío. La purificación por cromatografía en sílice (DCM después EtOAc a EtOAc: MeOH 85:15) dio (26) como un polvo ligeramente amarillo (1.76 g, 97 %). ^1H NMR (d_6 DMSO) δ 1.03 (s, 9H, *t*Bu), 2.25-2.32 (m, 1H, H-2'), 2.06-2.47 (m, 1H, H-2'), 3.71-3.90 (m, 2H, H-5'), 3.90-3.96 (m, 1H, H-4'), 4.32 (m, 2H, CH_2N), 4.46 (m, 1H, H-3'), 5.42 (br s, 1H, OH), 6.53 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 7.38-7.64 (m, 11H, H-8 y H_{Ar}), 8.16 (s, 1H, H-2), 10.12 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH).

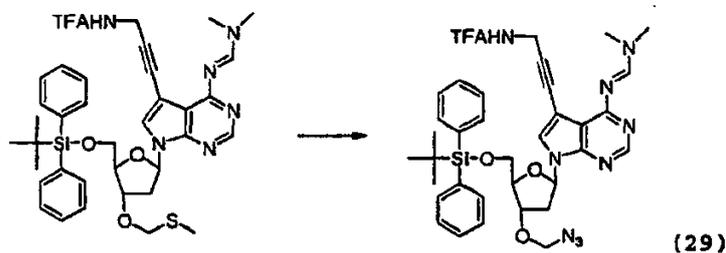


5 **5'-O-(*tert*-Butildifenilsilil)-7-deaza-4-*N,N*-dimetilformadin-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiadenosina (27)**. Una solución del nucleósido (26) (831 mg, 1.30 mmol) se disolvió en una mezcla de MeOH:N,N-dimetilacetato (30 ml: 3ml) y se agitó a 40°C. La reacción monitoreada por TLC, se completó después de 1 h. Se eliminó el disolvente a vacío. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc: MeOH 95:5) dio (27) como un polvo ligeramente marrón (777 mg, 86 %). ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 0.99 (s, 9H, tBu), 2.22-2.29 (m, 1H, H-2'), 2.50-2.59 (m, 1H, H-2'), 3.13 (s, 3H, CH₃), 3.18 (s, 3H, CH₃), 3.68-3.87 (m, 2H, H-5'), 3.88-3.92 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 2H, CH₂N), 4.43 (m, 1H, H-3'), 6.56 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.36-7.65 (m, 10H, H_{Ar}), 7.71 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, CH), 8.8 (s, 1H, H-2), 10.12 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH).



15 **5'-O-(*tert*-Butildifenilsilil)-7-deaza-4-*N,N*-dimetilformadin-3'-O-metilmetoxi-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiadenosina (28)**.

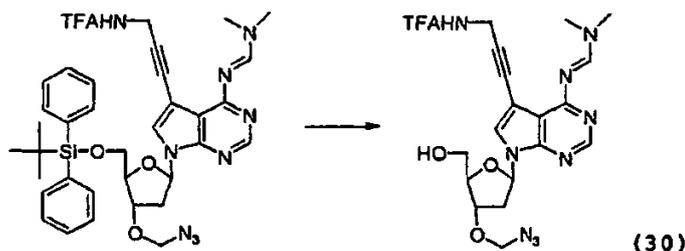
20 A una solución de (27) (623 mg, 0.89 mmol) en DMSO seco (8 ml) se añadieron ácido acético (775 μl, 13.35 mmol) y anhídrido acético (2.54 ml, 26.7 mmol). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se vertió después en EtOAc y solución de NaHCO₃ saturada acuosa (1:1) y se agitó vigorosamente. La capa orgánica se lavó una vez más con NaHCO₃ saturado acuoso y se secó sobre MgSO₄. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, el producto (28) se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc: éter de petróleo 1:2, después EtOAc) produciendo (28) (350 mg, 52 %). ¹H NMR (d₆ DMSO): δ, 1.0 (s, 9H, tBu), 2.09 (s, 3H, SCH₃), 2.41-2.48 (m, 1H, H-2'), 2.64-2.72 (m, 1H, H-2'), 3.12 (s, 3H, CH₃), 3.17 (s, 3H, CH₃), 3.66-3.89 (m, 2H, H-5'), 4.04 (m, 1H, H-4'), 4.26 (m, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 4.67 (m, 1H, H-3'), 4.74 (br s, 2H, CH₂), 6.49 (t, *J* = 6.1, 8.1 Hz, 1H, H-1'), 7.37-7.48 (m, 5H, H_{Ar}), 7.58-7.67 (m, 5H, H_{Ar}), 7.76 (s, 1H, H-8), 8.30 (s, 1H, CH), 8.79 (s, 1H, H-2), 10.05 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH).



30 **3'-O-Azidometil-5'-O-(*tert*-butildifenilsilil)-7-deaza-4-*N,N*-dimetilformadin-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiadenosina (29)**.

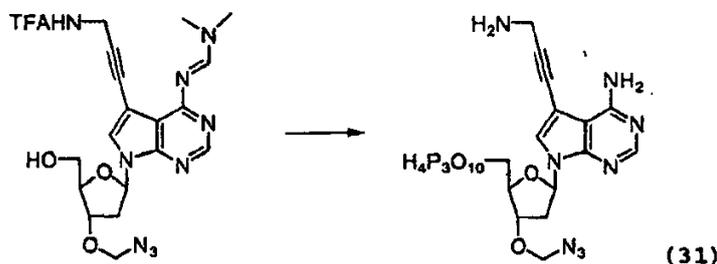
35 A una solución de (28) (200 mg, 0.26 mmol) y ciclohexeno (0.135 ml, 1.3 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 ml) a 0 °C, se añadió cloruro de sulfurilo (32 μl, 0.39 mmol) bajo N₂. Después de 10 min, la TLC indicó el consumo total de los nucleósidos (28). El disolvente se evaporó y el residuo se sometió a alto vacío por 20 min. Este se disolvió después nuevamente en

DMF seco (3 ml), se enfrió hasta 0°C y se trató con NaN₃ (86 mg, 1.3 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente por 3h. La reacción se particionó entre EtOAc y agua. Las fases acuosas se extrajeron con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se combinaron y se secaron sobre MgSO₄. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, la mezcla se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc) produciendo un aceite (29) (155 mg, 80 %),
 5 ¹H NMR (d₆ DMSO): δ 0.99 (s, 9H, tBu), 2.45-2.50 (m, 1H, H-2'), 2.69-2.78 (m, 1H, H-2'), 3.12 (s, 3H, CH₃), 3.17 (s, 3H, CH₃), 3.67-3.88 (m, 2H, H-5'), 4.06 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 2H, CH₂), 4.61 (m, 1H, H-3'), 4.84-4.97 (m, 2H, CH₂), 6.58 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.35-7.47 (m, 5H, H_{Ar}), 7.58-7.65 (m, 5H, H_{Ar}), 7.77 (s, 1H, H-8), 8.30 (s, 1H, CH), 8.79 (s, 1H, H-2), 10.05 (br s, 1H, NH).



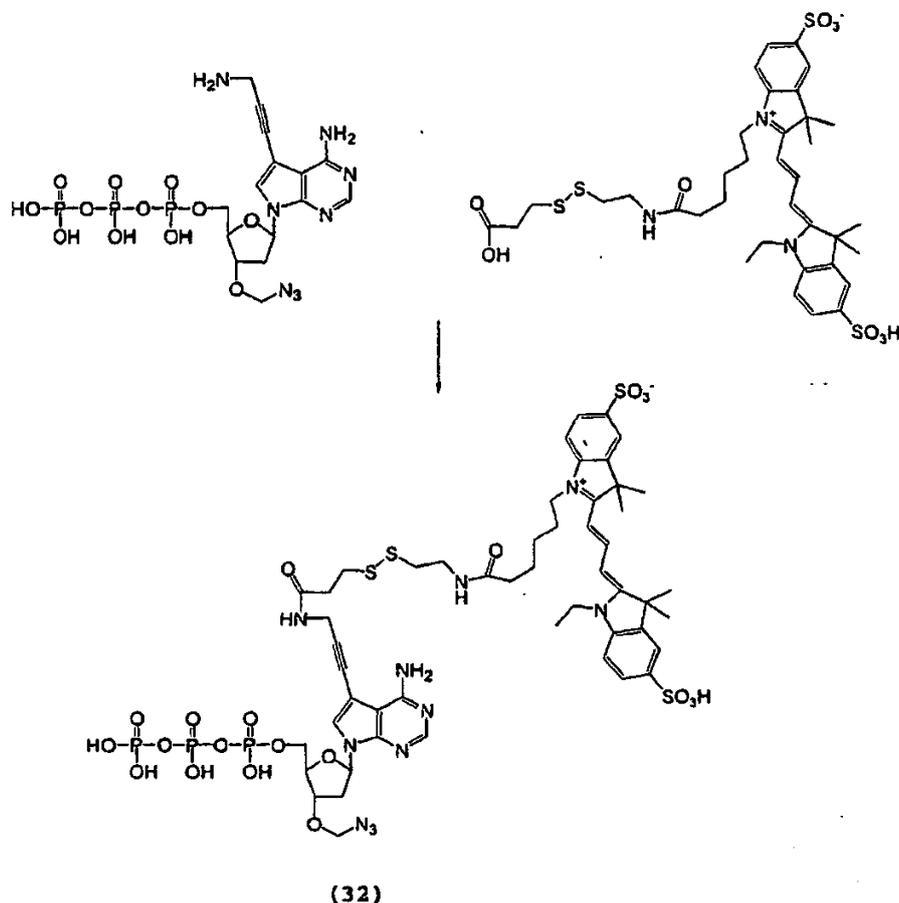
3'-O-Azidometil-7-deaza-4-N,N-dimetilformadin-7-[3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-prop-1-inil]-2'-deoxiadenosina (30).

Una solución de (29) (155 mg, 0.207 mmol) en solución en tetrahidrofurano (THF) (3 ml) se trató con TBAF (1 M en THF, 228 µl) a 0°C. El baño de hielo se eliminó después y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 h la TLC indicó el consumo total de los nucleósidos. El disolvente se eliminó. La purificación por cromatografía en sílice (EtOAc:MeOH 95:5) dio (30) (86 mg, 82 %) como un aceite marrón pálido. ¹H NMR (d₆ DMSO) δ 2.40-2.48 (dd, J = 8.1, 13.6 Hz, 1H, H-2'), 2.59-2.68 (dd, J = 8.3, 14 Hz, 1H, H-2'), 3.12 (s, 3H, CH₃), 3.17 (s, 3H, CH₃), 3.52-3.62 (m, 2H, H-5'), 4.02 (m, 1H, H-4'), 4.28 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂NH), 4.47 (m, 1H, H-3'), 4.89 (s, 2H, CH₂N₃), 5.19 (t, J = 5.6 Hz, 1H, OH),
 20 6.49 (dd, J = 8.1, 8.7 Hz, 1H, H-1'), 7.88 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, CH), 8.80 (s, 1H, H-2), 10.08 (s, 1H, NH).



7-(3-Aminoprop-1-inil)-3'-O-azidometil -7-deaza-2'-deoxiadenosina 5'-O-nucleósido trifosfato (31).

El nucleósido (30) y la esponja de protones se secaron sobre P₂O₅ al vacío durante la noche. Una solución de (30) (150 mg, 0.294 mmol) y esponja de protones (126 mg, 0.588 mmol) en trimetilfosfato (980 µl) se agitó con tamices moleculares de 4Å por 1 h. El POCl₃ recientemente destilado (36 µl, 0.388 mmol) se añadió y la solución se agitó a 4°C por 2h. La mezcla se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente y se añadieron la solución de bis (tri-n-butil amonio) pirofosfato 0.5 M en DMF (2.35 ml, 1.17 mmol) y tri-n-butil amina anhidra (560 µl, 2.35 mmol). Después de 5 min, la reacción se inactivó con tampón TEAB (trietilamonio bicarbonato) 0.1 M (15 ml) y se agitó por 3h. El agua se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en amoniaco concentrado (p 0.88, 15 ml) y se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó después hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y la solución se aplicó a una columna DEAE-Sephadex A-25. Se realizó la MPLC con un gradiente lineal de TEAB 0.05 M a 1 M. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y se evaporaron hasta secarse. El residuo se disolvió en agua y se purificó adicionalmente por HPLC. HPLC: t_r(31) : 19.94 min (columna preparativa Zorbax C18, gradiente: B al 5% a 35% en 20 min, tampón A TEAB 0.1M, tampón B MeCN). El producto (31) se aisló como una espuma blanca (17.5 µmol, 5.9%, ε₂₈₀ = 15000). ¹H NMR (D₂O) δ 2.67-2.84 (2m, 2H, H-2'), 4.14 (m, 2H, CH₂NH), 4.17-4.36 (m, 2H, H-5'), 4.52 (br s, H-4'), 6.73 (t, J = 6.6 Hz, H-1'), 8.06 (s, 1H, H-8), 8.19 (s, 1H, H-2). ³¹P NMR (D₂O) δ -5.07 (d, J = 21.8 Hz, 1P, P_γ), -10.19 (d, J = 19.8 Hz, 1P, P_α), -21.32 (t, J = 19.8 Hz, 1P, P_β). Masa (electronebulización negativa) calcul. para C₁₅H₂₁N₈O₁₂P₃ 598.05, encontrada 596.



Al enlazador de disulfuro Cy3 (1.3 μmol) en solución en DMF (450 μl) se añadió a 0°C 50 μl de una mezcla de hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, 1-hidroxibenzotriazol hidratado y N-metilmorfolina (26 μM cada uno) en DMF. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se monitoreó por TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 3:7) hasta que el enlazador colorante se consumió. Después se añadió DMF (400 μl) a 0°C, seguido por el nucleótido (31) (1.2 μmol) en solución en agua (100 μl) y la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 4:6) mostró el consumo completo del éster activado y una mancha roja oscura apareció en la línea base. La reacción se inactivó con tampón TEAB (0.1M, 10 ml) y se cargó en una columna DEAE Sephadex (2 x 5 cm). La columna se eluyó primero con tampón TEAB 0.1 M (100 ml) para lavar los residuos orgánicos y después tampón TEAB 1 M (100 ml). El trifosfato deseado (32) se eluyó con tampón TEAB 1 M. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se evaporaron y se purificaron por HPLC. Condiciones de la HPLC: $t_r(32)$: 22.44 min (columna preparativa Zorbax C18, gradiente: B al 5% a 35% en 20 min, tampón A TEAB 0.1M, tampón B MeCN). El producto se aisló como un sólido rosa oscuro (0.15 μmol , 12.5%, $\epsilon_{550} = 150000$). ¹H NMR (D₂O) δ 2.03 (t, 2H, CH₂), 2.25 (m, 1H, H-2'), 2.43 (m, 1H, H-2'), 2.50 (m, 2H, CH₂), 2.66 (m, 2H, CH₂), 3.79 (m, 2H CH₂), 3.99 (m, 4H, CH₂N, H-5'), 4.18 (br s, 1H, H-4'), 6.02, 6.17 (2d, $J = 13.64$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.30 (dd, $J = 6.06, 8.58$ Hz, H-1'), 7.08, 7.22 (2d, 2H, 2 x =CH), 7.58-7.82 (m, 5H, H_{Ar}, H-2, H-8), 8.29 (m, =CH). ³¹P NMR (D₂O) δ -4.83 (m, 1P, P _{γ}), -10.06 (m, 1P, P _{α}), -20.72 (m, 1P, P _{β}).

Incorporación de la enzima de los 3'-Azidometil dNTP

A un ADN cebador/molde 100 nM (cebador previamente marcado con ³²P y polinucleótido quinasa T4) en Tris-HCl pH 8.8 50 mM, Tween-20 0.01%, y MgSO₄ 4 mM, adicionar 2 μM del compuesto 6 y polimerasa 100 nM (*Thermococcus sp.* 9°N exo Y409V A485L suministrado por New England Biolabs). El patrón consiste de una corrida de 10 bases de adenina para mostrar el efecto del bloqueo. La reacción se calienta hasta 65 C por 10 min. Para mostrar el bloqueo completo, se realiza un seguimiento con los cuatro trifosfatos nucleósidos nativos, desbloqueados. La incorporación

cuantitativa de un solo azidometilo que bloquea al dTTP se puede observar y por lo tanto el grupo azidometil se puede ver que actúa como un bloqueo efectivo para la incorporación posterior.

5 Al unir un ADN en horquilla (cebador auto complementario unido covalentemente / molde) a una perla de estreptavidina la reacción se puede realizar a través de múltiples ciclos, como se muestra en las Figuras 5 y 6.

Preparación de las perlas de estreptavidina

10 Eliminar el tampón de almacenamiento y lavar las perlas 3 veces con tampón TE (Tris-HCl pH 8, 10 mM y EDTA, 1 mM). Resuspender en tampón B & W (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 2.0 M NaCl), adicionar ADN en horquilla marcado con ³²P biotinilado con una secuencia patrón colgante adecuada. Dejar reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Eliminar el tampón y lavar las perlas 3 veces con tampón TE.

Incorporación del nucleósido trifosfato completamente funcional (FFN)

15 A una solución de Tris-HCl pH 8.8 50 mM, Tween-20 0.01%, MgSO₄ 4 mM, MnCl₂ 0.4 mM (excepto el ciclo 1, 0.2 mM), adicionar 2 μM de FFN y 100 nM de polimerasa. Esta solución se añade después a las perlas y se mezcla vigorosamente y se incuba a 65°C por 10-15 minutos. La mezcla de reacción se elimina y las perlas se lavan 3 veces con tampón TE.

20

Etapas de desbloqueo

25 La sal trisódica de tris-(2-carboxietil)fosfinas (TCEP) (0.1M) se añade a las perlas y se mezcla vigorosamente. La mezcla se incubó después a 65°C por 15 minutos. La solución de desbloqueo se elimina y las perlas se lavan 3 veces con tampón TE.

Etapas de recubrimiento

30 Se añade yodoacetamida (431 mM) en fosfato 0.1 mM pH 6.5 a las perlas y se mezcla vigorosamente, después esto se deja a temperatura ambiente por 5 minutos. La solución de recubrimiento se elimina y las perlas se lavan 3 veces con tampón TE.

Repetir según sea necesario

35 Los productos de reacción se pueden analizar mediante la colocación de la solución de perlas en el pocillo de un gel de secuenciación estándar de ADN de poliacrilamida al 12% en tampón de carga de formamida al 40%. Correr el gel en condiciones desnaturizantes provoca que el ADN se libere de las perlas y sobre el gel. Los cambios de banda del ADN se ven afectados tanto por la presencia del colorante como por la adición de nucleótidos adicionales y por lo tanto la escisión del colorante (y el bloqueo) con la fosfina causa un cambio de movilidad en el gel.

40

Dos ciclos de incorporación con los compuestos 18 (C), 24 (G) y 32 (A) y seis ciclos con el compuesto 6 pueden observarse en las Figuras 5 y 6.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de nucleótido modificada que comprende una base purina o pirimidina y una porción de azúcar ribosa o deoxiribosa con un grupo de bloqueo 3'-OH removible covalentemente unido a ella, tal que el átomo de carbono 3' tiene unido un grupo de la estructura
- O-Z
- 10 en donde Z es cualquiera de $-C(R')_2-N(R'')_2-C(R')_2-N(H)R''$, y $-C(R')_2-N_3$, en donde cada R'' es, o es parte de un grupo protector removible;
- 15 cada R' es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heterocíclico, acilo, ciano, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi o amido, o un marcador detectable unido a través de un grupo de enlace; o $(R')_2$ representa un grupo alquilideno de la fórmula $=C(R''')_2$ en donde cada R''' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y
- 20 en donde dicha molécula puede reaccionar para producir un producto intermedio en el cual cada R'' se intercambia por H, dicho producto intermedio se disocia bajo condiciones acuosas para proporcionar una molécula con un 3'OH libre.
- 25 2. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 en donde R' es un alquilo o alquilo sustituido.
3. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde - Z es de la fórmula $-C(R')-N_3$.
- 30 4. Una molécula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde Z es un grupo azidometilo.
5. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde R'' es un grupo bencilo o bencilo sustituido.
- 35 6. Una molécula de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde dicha base se une a un marcador detectable a través de un enlazador escindible o un enlazador no escindible.
7. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 6 en donde dicho enlazador es escindible.
8. Una molécula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde un marcador detectable está unido a la molécula a través del grupo de bloqueo por un enlazador escindible o no escindible.
- 40 9. Una molécula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde dicho marcador detectable es un fluoróforo.
10. Una molécula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en donde dicho enlazador sensible a ácido, fotolábil o contiene un enlace disulfuro.
- 45 11. Una molécula de nucleótido modificada como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende uno o más átomos ^{32}P en su porción fosfato.
- 50 12. Un método para controlar la incorporación de un nucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 y complementario a un segundo nucleótido en un polinucleótido objetivo de cadena sencilla en una reacción de secuenciación o síntesis que comprende incorporar en el polinucleótido creciente complementario dicho nucleótido, la incorporación de dicho nucleótido previene o bloquea la introducción de moléculas de nucleósidos o nucleótidos posteriores en dicho polinucleótido creciente complementario.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la incorporación de dicho primer nucleótido se realiza por una transferasa o polimerasa terminal o una transcriptasa inversa.
- 55 14. El método de la reivindicación 13 en donde la polimerasa es un *Thermococcus sp*
15. El método de la reivindicación 14 en donde el *Thermococcus sp* es 9°N o un mutante simple o mutante doble del mismo.
16. El método de la reivindicación 15 en donde el mutante doble es -Y409V A485L.

- 5 17. Un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla, que comprende monitorear la incorporación secuencial de los nucleótidos complementarios, en donde al menos una incorporación es de un nucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 y en donde la identidad del nucleótido incorporado se determina detectando el marcador enlazado a la base, y el grupo de bloqueo y dicho marcador se eliminan antes de la introducción del siguiente nucleótido complementario.
- 10 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17 en donde el marcador del nucleótido y el grupo de bloqueo se eliminan en una sola etapa de tratamiento químico.
- 15 19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende:
(a) proporcionar una pluralidad de diferentes nucleótidos en donde dicha pluralidad de diferentes nucleótidos son como los definidos en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 y en donde el marcador detectable unido a cada tipo de nucleótido puede ser distinguido tras la detección del marcador detectable usado para otros tipos de nucleótidos;
(b) incorporar el nucleótido en el complemento del polinucleótido objetivo de cadena sencilla;
(c) detectar el marcador del nucleótido de (b), y de ese modo determinar el tipo de nucleótido incorporado;
(d) eliminar el marcador del nucleótido de (b) y el grupo de bloqueo; y
(e) opcionalmente repetir las etapas (b)-(d) una o más veces;
y de ese modo determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena sencilla.
- 20 20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde cada uno de los nucleótidos se ponen en contacto con el objetivo secuencialmente, con la eliminación de los nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido, y en donde la detección y eliminación del marcador y el grupo de bloqueo se lleva a cabo después de la adición de cada nucleótido, o después de la adición de los cuatro nucleótidos.
- 25 21. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde cada uno de los nucleótidos se ponen en contacto con el objetivo simultáneamente, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo.
- 30 22. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una primera etapa y una segunda etapa, en donde la primera etapa, una primera composición que comprende dos de los cuatro nucleótidos se pone en contacto con el objetivo y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador, y en donde en la segunda etapa, una segunda composición que comprende los dos nucleótidos no incluidos en la primera composición se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y después de la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo, y en donde las etapas primera y segunda se repiten opcionalmente una o más veces.
- 35 23. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una primera etapa y una segunda etapa, en donde la primera etapa, una primera composición que comprende uno de los cuatro nucleótidos se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo y en donde la segunda etapa, una segunda composición que comprende los tres nucleótidos no incluidos en la primera composición se ponen en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo y en donde la primera y segunda etapas se repiten opcionalmente una o más veces.
- 40 24. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una primera etapa y una segunda etapa, en donde la primera etapa, una primera composición que comprende tres de los cuatro nucleótidos se ponen en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo y en donde la segunda etapa, una composición que comprende el nucleótido no incluido en la primera composición se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador y el grupo de bloqueo y en donde la primera y segunda etapas se repiten opcionalmente una o más veces.
- 45 25. Un kit que comprende:
(a) una pluralidad de diferentes nucleótidos en donde dicha pluralidad de diferentes nucleótidos son como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10; y
(b) materiales de empaque para ello.
- 50 55

- 5
26. Un kit de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el marcador detectable en cada nucleótido puede distinguirse tras la detección del marcador detectable usado para cualquiera de los otros tipos de nucleótidos.
27. El kit de la reivindicación 25 ó 26, comprende además una enzima y tampones adecuados para la acción de la enzima.
28. Uso de un nucleótido como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en un método de secuenciación de Sanger o del tipo Sanger.
- 10
29. Un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado de las reivindicaciones 1-11.
30. Un nucleótido trifosfato que comprende un nucleótido modificado de las reivindicaciones 1-11.

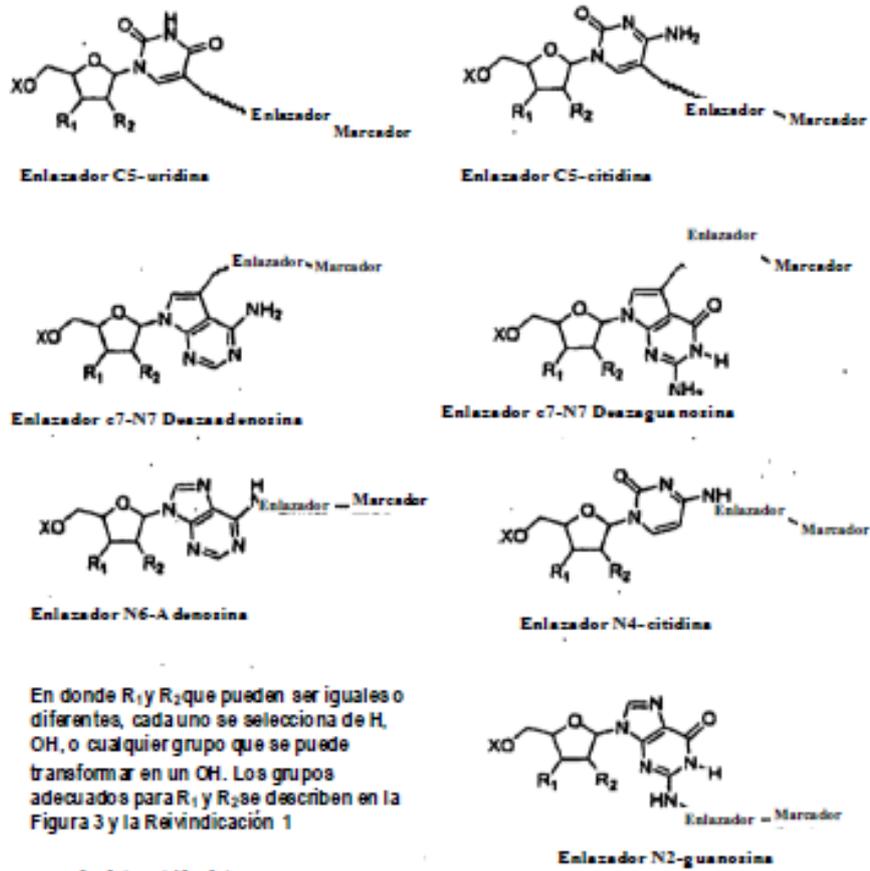


FIG. 1

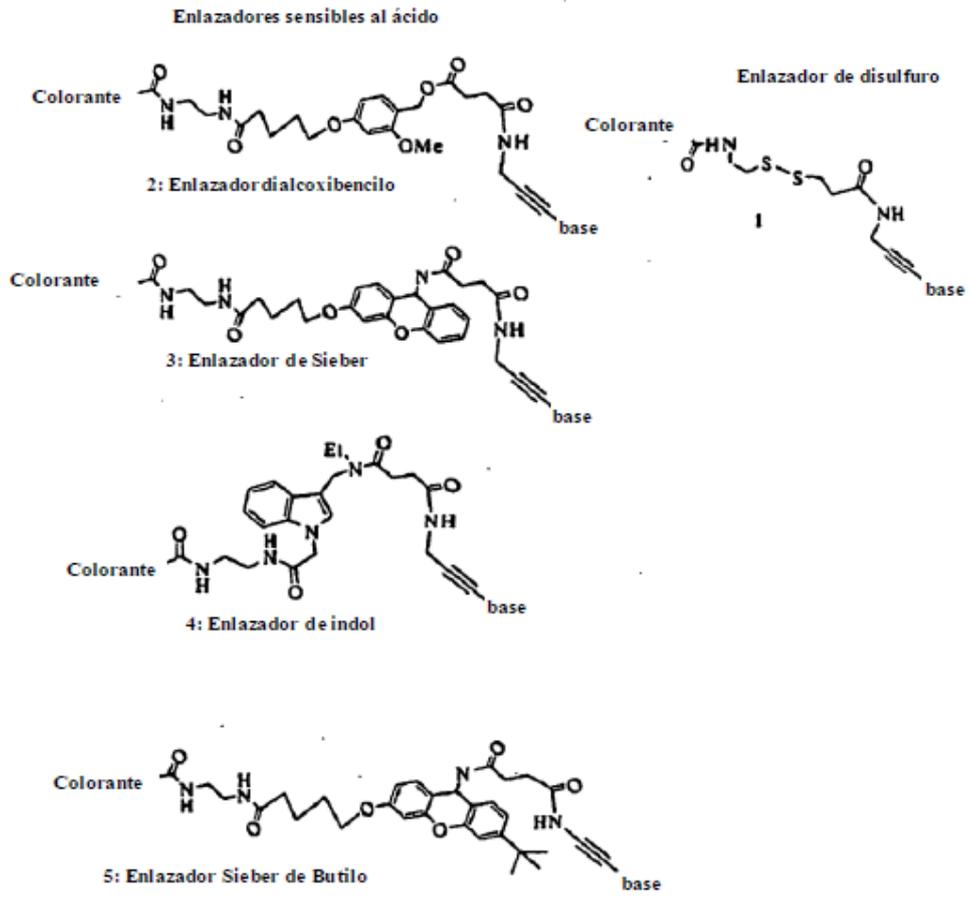


FIG. 2

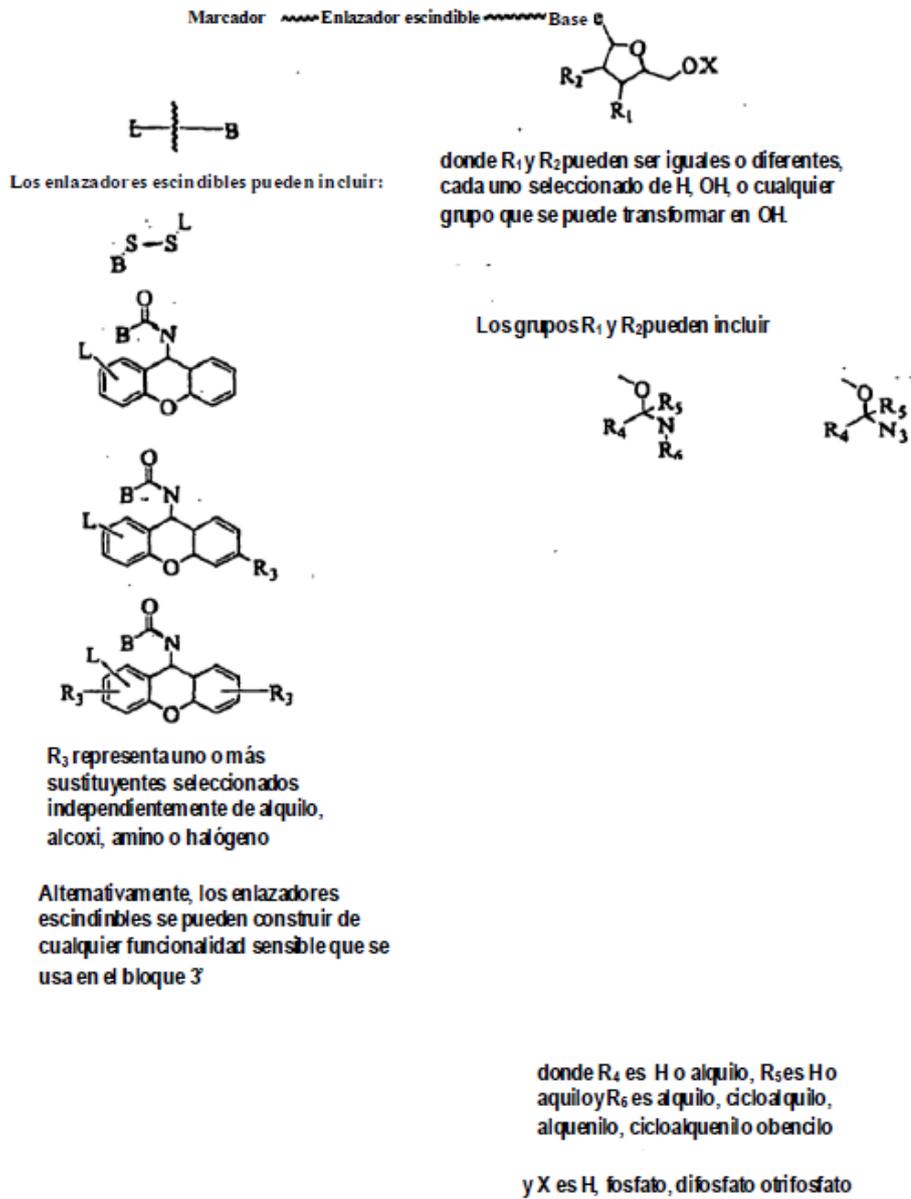


FIG. 3

He miaminales protegidos:

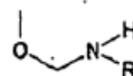
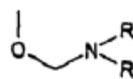


FIG. 4

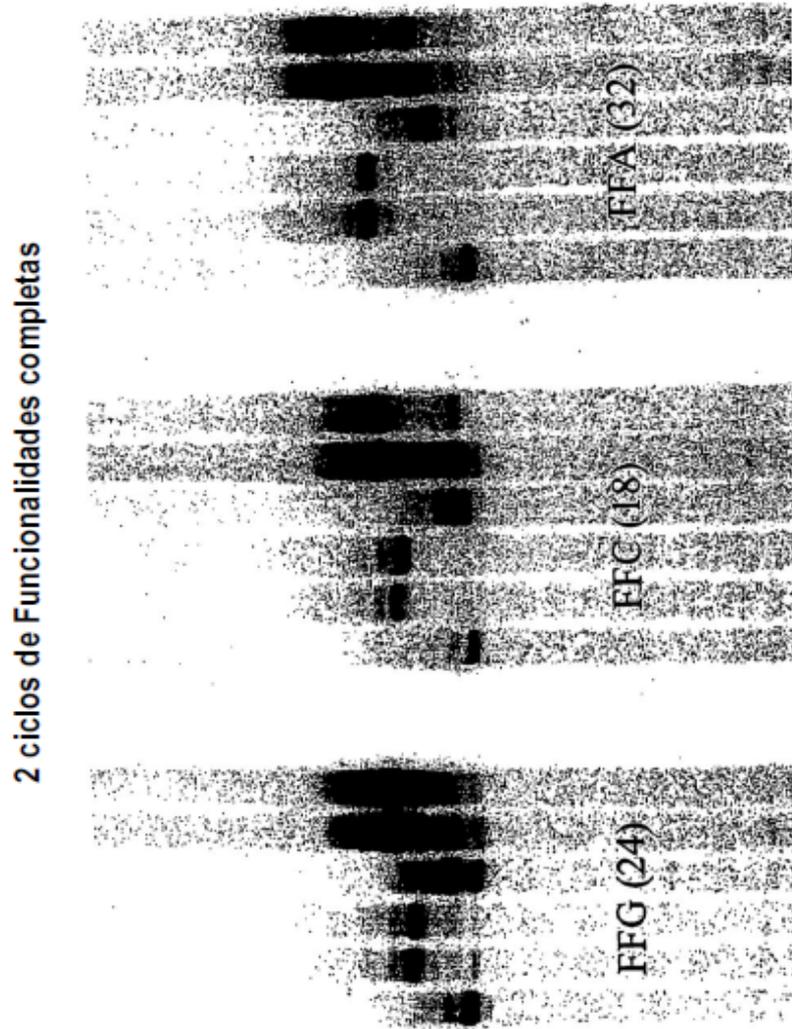


FIG. 5

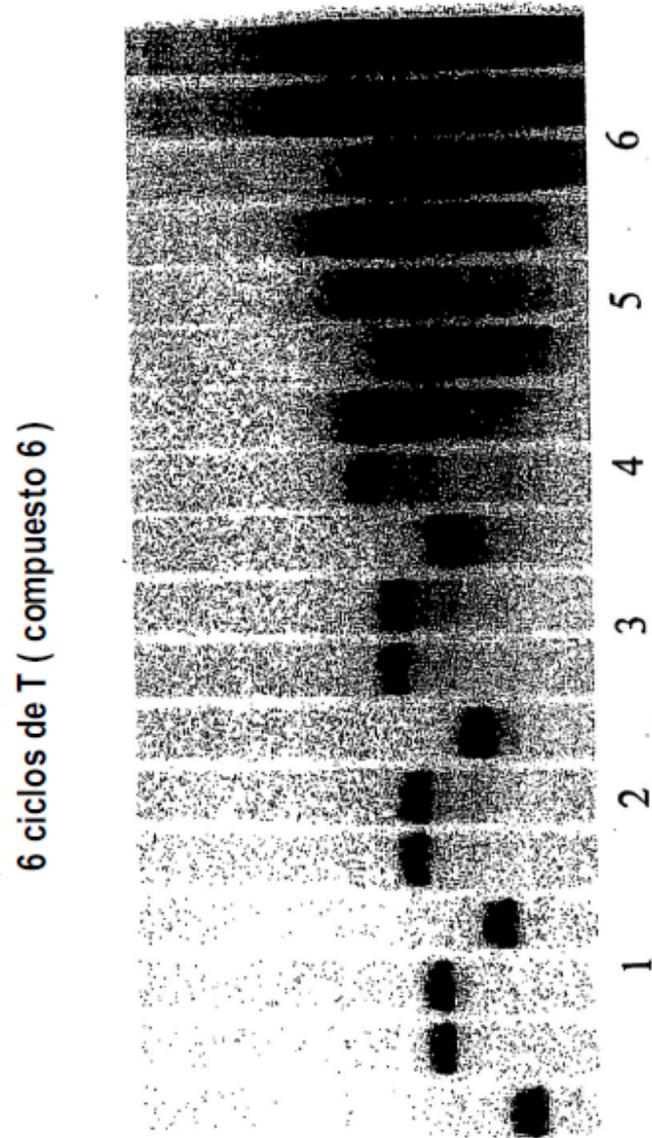


FIG. 6



Seguimiento 10 0

FIG. 7