

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 951**

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 09005942 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016** **EP 2119722**

54 Título: **Nucleótidos etiquetados**

30 Prioridad:

23.08.2002 US 227131

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MILTON, JOHN;
RUEDIGER, SILKE y
LIU, XIAOHAI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 604 951 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 etiquetados

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a nucleótidos etiquetados. En particular, esta invención divulga nucleótidos, que tienen una etiqueta detectable que puede retirarse, y su uso en métodos de secuenciación de polinucleótidos.

Antecedentes

Los avances en el estudio de moléculas se han realizado, en parte, por el mejoramiento en las tecnologías utilizadas para caracterizar las moléculas o sus reacciones biológicas. En particular, el estudio de los ácidos nucleicos ADN y ARN se ha beneficiado de desarrollar tecnologías usadas para análisis de secuencia y el estudio de eventos de hibridación.

10 Un ejemplo de las tecnologías que han mejorado el estudio de ácidos nucleicos es el desarrollo de matrices de ácidos nucleicos inmovilizados. Estas matrices consisten normalmente en una matriz de alta densidad de polinucleótidos inmovilizados sobre un material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, Fodor et al., Trends Biotech. 12:19-26, 1994, el cual describe maneras de ensamblar los ácidos nucleicos usando una superficie de vidrio sensibilizada químicamente, protegida por una máscara, pero expuestos en áreas definidas para permitir la sujeción de fosforamidas de nucleótido
15 modificadas de manera adecuada. Las matrices fabricadas también pueden fabricarse por la técnica de "localizar" polinucleótidos conocidos sobre un soporte sólido en posiciones predeterminadas (por ejemplo, Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383, 1995).

20 Un desarrollo adicional en la tecnología de matrices es la unión de los polinucleótidos al material de soporte sólido para formar matrices de una sola molécula. Las matrices de este tipo se divulgan en la solicitud internacional de patente WO 00/06770. La ventaja de estas matrices es que las reacciones pueden monitorearse al nivel de la molécula individual y puede recopilarse información sobre grandes cantidades de moléculas individuales a partir de una sola reacción.

25 Para que las matrices de ADN sean útiles, tienen que determinarse las secuencias de las moléculas. La patente estadounidense No. 5,302,509 divulga un método para secuenciar polinucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido. El método se basa en la incorporación de bases A, G, C y T bloqueadas en 3', cada una de las cuales tiene una etiqueta fluorescente marcada, al polinucleótido inmovilizado, en presencia de polimerasa de ADN. La polimerasa incorpora una base complementaria al polinucleótido diana, pero se impide otra adición por parte del grupo de bloqueo 3'. La etiqueta de la base incorporada puede determinarse luego y el grupo de bloqueo puede retirarse mediante disociación química para permitir que ocurra una polimerización adicional.

30 Welch et al. (Chem. Eur. J. 5(3):951-960, 1999) describe la síntesis de trifosfatos de nucleótido modificados con un grupo de bloqueo de O 3' el cual es fotolábil y fluorescente. Los nucleótidos modificados están destinados para usar en experimentos de secuenciación de ADN. Sin embargo, estos nucleótidos demostraron ser difíciles de incorporar a un polinucleótido existente debido a la incapacidad de caber en el sitio activo de enzima polimerasa.

35 Zhu et al. (Cytometry 28:206-211, 1997) también describe el uso de etiquetas fluorescentes unidas al nucleótido por medio del grupo base. Los nucleótidos etiquetados están destinados para uso en experimentos de hibridación in situ fluorescente (FISH), en los cuales se requiere una serie de nucleótidos etiquetados incorporados para producir un "código de barras" fluorescente.

El documento WO99/57321 describe el uso de nucleótidos que comprenden fluoróforos unidos al nucleótido mediante residuos conectores que pueden disociarse de modo químico o fotoquímico.

40 Los documentos WO 00/53812 y EP-A2-1 291 354 divulgan compuestos de nucleótidos de estructura general fluoróforo-S-S-conector-nucleótido y su uso en métodos de ensayo de ácido nucleico. El documento WO00/53812 también hace referencia a la disociación con peryodato de un enlace cis-glicol entre el nucleótido y el fluoróforo.

45 El documento WO 01/92284 divulga el uso de grupos que pueden disociarse con enzimas, los cuales unen los residuos de bloqueo y de reporte con los nucleótidos. Se prefiere que estos grupos que pueden disociarse con enzimas sean iguales, es decir que tanto los residuos bloqueadores como los residuos reporteros estén unidos al nucleótido por una cadena que comprende un grupo disociable por una enzima común. Los grupos disociables descritos en el documento WO 01/92284 son ésteres y amidas, disociables por esterases y amidasas respectivamente.

El documento WO02/29003 describe análogos de nucleótidos que contienen una etiqueta enlazada por conectores disociables a la base de nucleótido, o a un análogo de la base. Se describen conectores foto-disociables que comprenden residuos de 2-nitrobenzilo.

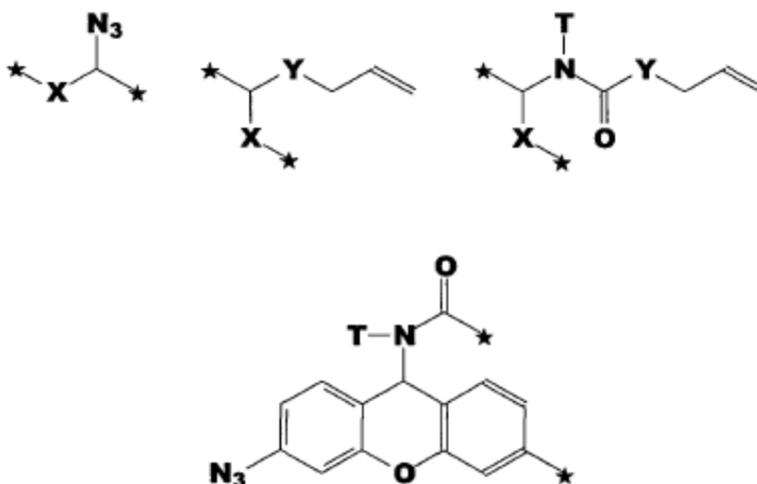
50 Resumen de la invención

5 Los presentes inventores han encontrado de manera sorprendente que algunos conectores que conectan las bases de nucleótidos con etiquetas separables, por ejemplo fluoróforos, pueden disociarse utilizando fosfinas hidrosolubles o catalizadores de metal de transición hidrosolubles formados a partir de un metal de transición y ligandos al menos parcialmente hidrosolubles. En solución acuosa estos últimos forman complejos de metal de transición al menos parcialmente hidrosolubles.

10 Los nucleótidos etiquetados que comprenden tales conectores, y los métodos para usarlos, son claramente ventajosos en el contexto de las técnicas llevadas a cabo en medios acuosos tales como reacciones de secuenciación, síntesis de polinucleótidos, amplificación de ácido nucleico, ensayos de hibridación de ácido nucleico, estudios de polimorfismo de un solo nucleótido y otras técnicas que utilizan enzimas tales como polimerasas, transcriptasas inversas, transferasas terminales u otras enzimas que modifican el ADN. La invención es especialmente útil en técnicas que usan dNTPs etiquetados, tales como traslación de incisión, etiquetado con cebador aleatorio, etiquetado de extremo (por ejemplo con desoxinucleotidiltransferasa), transcripción inversa o amplificación de ácido nucleico.

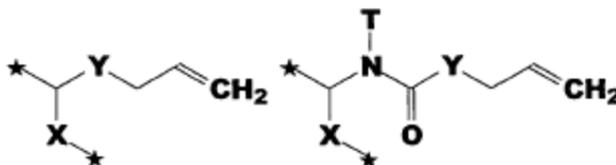
15 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un nucleótido o nucleósido que tienen una base unida a una etiqueta desprendible por medio de un conector disociable, caracterizados porque el conector disociable comprende un grupo alquilo o azido.

El conector disociable puede contener un residuo seleccionado del grupo que comprende:



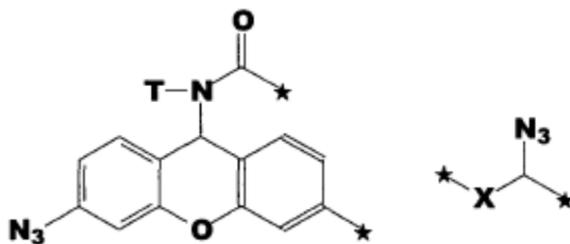
20 (en el que X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, Y se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y N (alilo), T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indican donde se conecta el residuo al resto del nucleótido o nucleósido).

En la presente también se describe un método de disociación de un conector que contiene un residuo seleccionado de los grupos que comprenden:



25 (en los cuales X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, Y se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y N (alilo), T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indica donde se conecta el residuo con el resto de un nucleótido o nucleósido), y dicho conector se encuentra presente en el nucleótido o nucleósido y la base del mismo se conecta a una etiqueta detectable; dicho método comprende poner en contacto el nucleótido o el nucleósido con un catalizador de metal de transición, a base de fosfina, hidrosoluble.

En la presente también se describe un método de disociación de un conector que contiene un residuo seleccionado de los grupos que comprenden:



5 (en los cuales X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indica donde se conecta el residuo con el resto del nucleótido o nucleósido), y dicho conector se encuentra presente en el nucleótido o nucleósido y la base del mismo se conecta a una etiqueta detectable; dicho método comprende poner en contacto el nucleótido o nucleósido con una fosfina hidrosoluble.

El método descrito es particularmente útil en reacciones de secuenciación. Un método para determinar una identidad de un nucleótido en un polinucleótido monocatenario diana puede comprender:

10 (a) proporcionar uno o más de los nucleótidos A, G, C y T o U en los cuales cada uno de dichos nucleótidos tiene una base que se sujeta a una etiqueta detectable marcada a través de un conector y dicho conector es disociable con una fosfina hidrosoluble; y un polinucleótido emergente, complementario al polinucleótido diana; y uno de dichos nucleótidos proporcionados es adecuado para incorporación a dicho polinucleótido emergente;

(b) incorporar el nucleótido adecuado para incorporación a dicho polinucleótido emergente; y

(c) llevar a cabo un método de disociación de un conector tal como se describe en la presente.

15 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra estructuras ejemplares de nucleótidos. Para cada estructura, X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato. R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y pueden seleccionarse de H, OH o cualquier grupo que pueda transformarse en un OH.

20 La figura 2 muestra algunas moléculas funcionales que incluyen algunos conectores disociables. En estas estructuras, R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser H, OH o cualquier grupo que pueda transformarse en un grupo OH, incluyendo un carbonilo. R₃ representa uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de grupos alquilo, alcoxilo, amino o halógeno. De manera alternativa, los conectores disociables pueden estar contruidos a partir de una funcionalidad lábil utilizada en el bloque 3'.

25 La figura 3 es una ilustración esquemática de los grupos de bloqueo OH 2' y 3' que pueden estar presentes en los nucleótidos o nucleósidos de acuerdo con la invención.

La figura 4 muestra los ciclos de incorporación de un difosfato de nucleósido T completamente funcional en comparación con una plantilla de poli A.

Descripción detallada

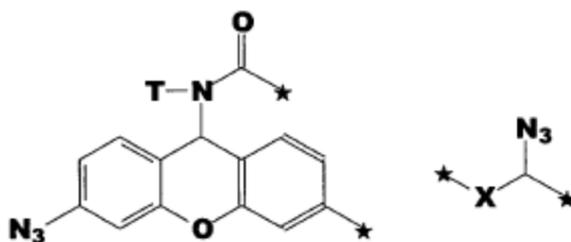
30 Las moléculas de nucleótido o de nucleósido de la invención tienen cada una una base que está unida a una etiqueta detectable a través de conectores que pueden disociarse por contacto con fosfinas hidrosolubles o catalizadores hidrosolubles que contienen metal de transición, los cuales se describen con mayor detalle más adelante. El residuo "T" es preferiblemente hidrógeno. La base puede ser una purina o una pirimidina. La base puede ser una desazapurina. La molécula puede tener un residuo de azúcar ribosa o desoxirribosa. El azúcar ribosa o desoxirribosa pueden incluir un grupo de protección unido a través del átomo de oxígeno 2' o 3'. El grupo de protección puede retirarse para exponer un OH 3'. La molécula puede ser un trifosfato de desoxirribonucleotido. La etiqueta detectable puede ser un fluoróforo.

La invención también abarca oligonucleótidos que comprenden uno o más nucleótidos de la invención. Preferiblemente al menos un nucleótido de la invención está presente en una posición terminal en tal oligonucleótido.

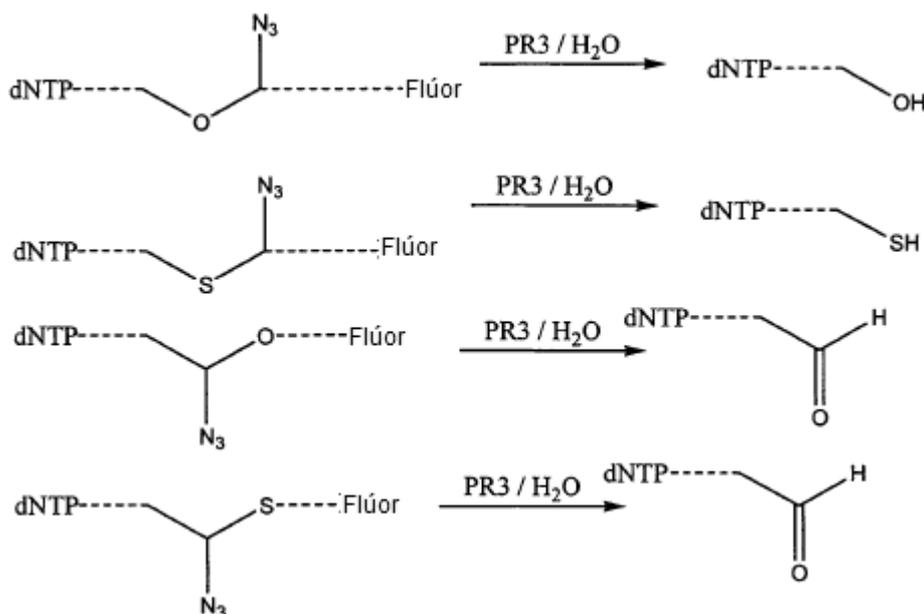
40 El conector puede unirse en la posición 5 en pirimidinas o en la posición 7 en purinas o desazapurinas. El rasgo característico de los nucleótidos y nucleósidos de la presente invención es la disposición del enlace a disociarse por algunas fosfinas hidrosolubles o catalizadores a base de fosfina de metal de transición. Puesto que los oligonucleótidos se manipulan en solución acuosa, las ventajas de esta hidrosolubilidad son evidentes.

Los conectores disociables presentes en los nucleósidos y nucleótidos de la invención comprenden cada uno un grupo alilo o azido.

Cuando los conectores comprenden un grupo que contienen azida, los conectores pueden contener un residuo de la fórmula:



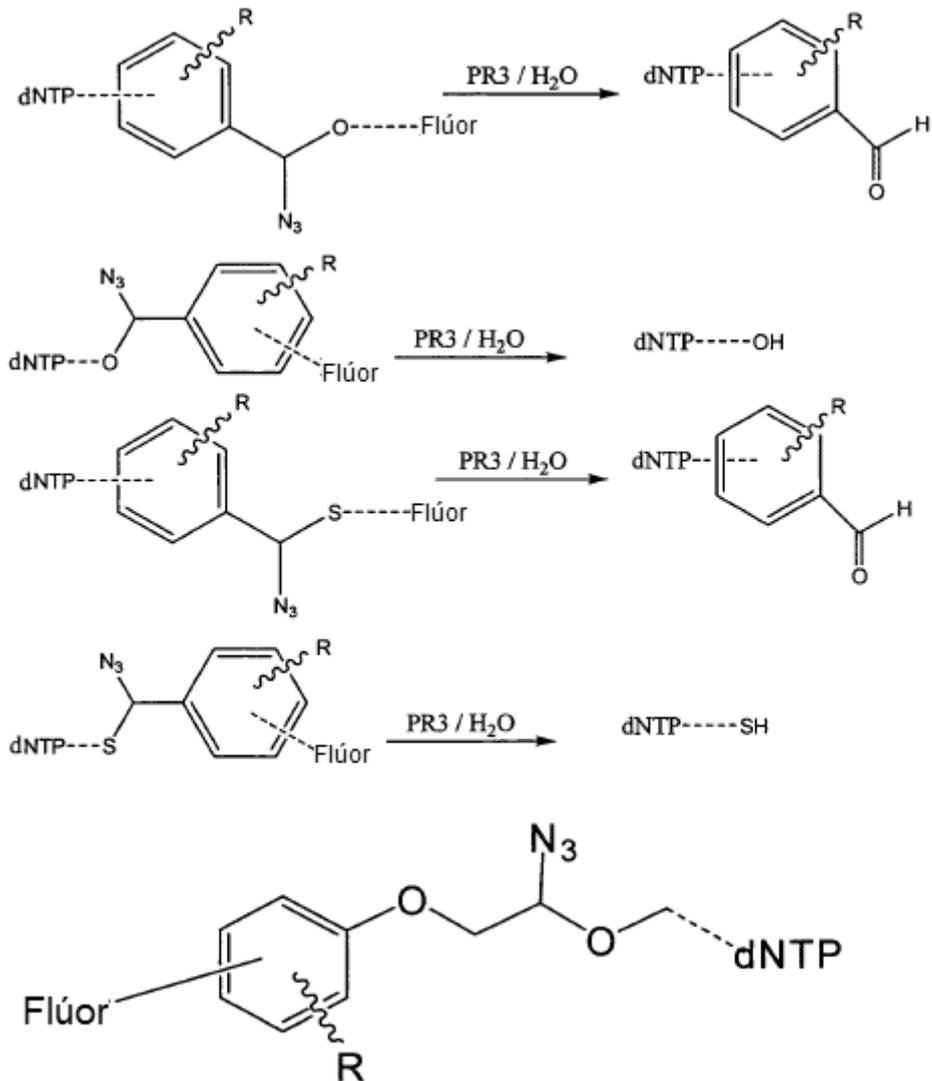
5 Estos residuos pueden estar presentes en cualquier orientación en el conector que conecta la base del nucleótido/nucleósido con la etiqueta detectable, es decir que cualquiera de los enlaces mostrados que terminan en asterisco en cada residuo puede estar más cerca de la base (o de la etiqueta) en cada nucleótido o nucleósido que el otro asterisco mostrado en cada estructura. De esta manera, la invención abarca nucleótidos y nucleósidos que tienen esquemáticamente las siguientes estructuras (mostradas a la izquierda) que pueden hacerse reaccionar con las fosfinas hidrosolubles (descritas con mayor detalle posteriormente) para generar los productos mostrados a la derecha, en los
10 cuales ha sido disociado el conector que contiene azida:



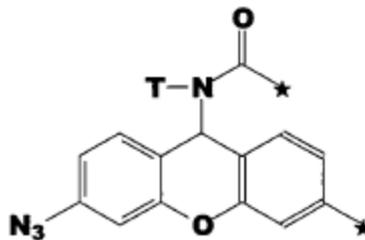
Mientras que los puntos de conexión * indican los puntos en los cuales se conectan los residuos al nucleótido o nucleósido, se apreciarán que estos puntos son generalmente los puntos en los cuales se conecta el residuo al resto del conector. En otras palabras, los residuos descritos en la presente que contienen grupos alilo o azido son generalmente parte de, antes
15 que constituir exclusivamente, el conector disociable.

Cuando el residuo es de fórmula $-X-CH(N_3)-$, la naturaleza de los sustituyentes a cualquier lado del residuo $-X-CH(N_3)-$ afecta la estabilidad del residuo y de esta manera la velocidad a la cual se disocia. Por ejemplo, cuando el conector contiene un grupo arilo sustituido unido al residuo en el cual los sustituyentes (indicados como "R" en las estructuras inmediatamente siguientes) son aceptores de electrones, esto se manifiesta en la manera en que se disocia el residuo.
20 Por ejemplo, los grupos aceptores de electrones sirven para estabilizar el enlace particularmente cuando X es O o S. Esto hace que la disociación ocurra más lentamente.

Más adelante se muestran esquemáticamente los resultados de cuatro disociaciones de constructos de nucleótido esquemáticos y una representación esquemática adicional de un constructo preferido. Las líneas punteadas que conectan el "flúor", "dNTP" o el grupo R con el anillo de benceno o los residuos disociables indican que la sustitución puede estar
25 en cualquier posición libre en el anillo de benceno y que los otros átomos (no mostrados) en el conector pueden estar presentes entre el motivo disociable mostrado y el nucleótido y la etiqueta detectable que conecta el conector:



Quando los residuos que contienen azida son conectores Sieber, es decir son de la fórmula

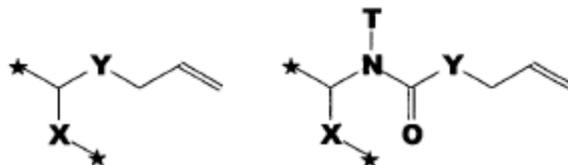


5 la disociación del residuo tiene lugar a través del enlace que conecta el anillo central de 6 miembros del triciclo con la amida de modo que se deja colgante un grupo amida terminal en cualquiera de la base o el fluoróforo después de la disociación.

10 Se apreciará que los residuos de conector Sieber que contienen azida pueden contener uno o más sustituyentes que pueden ser donantes de electrones (ejemplos incluyen alquilo o alcoxi, por ejemplo grupos alquilo de C₁₋₆ o alcoxi de C₁₋₆) o grupos aceptores de electrones (por ejemplo nitro, ciano, fluoro. Etc). La introducción de tales sustituyentes permite que la persona experta ajuste precisamente las condiciones en las cuales puede efectuarse la disociación.

Cuando los nucleótidos comprenden un grupo azida en el conector, este puede convertirse en el grupo de amina primaria con un tiol (en lugar de las fosfinas), preferiblemente un tiol hidrosoluble tal como ditiotreititol (DTT).

Cuando los conectores comprenden un grupo alilo, estos pueden ser de las fórmulas:



- 5 Tal como con los residuos que contienen azido discutidos antes, estos residuos enlazantes pueden estar presentes en cualquier orientación en el conector que conecta la base del nucleótido/nucleósido con la etiqueta detectable.

10 Cuando las conexiones comprenden residuos que contienen alilo, estos conectores pueden disociarse con catalizadores de metal de transición hidrosolubles formados a partir de un metal de transición y ligandos al menos parcialmente hidrosolubles. En una solución acuosa estos forman complejos de metal de transición al menos parcialmente hidrosolubles.

15 Las especies de metal de transición sirven para retirar el grupo alilo. Cuando el grupo alilo es parte de un carbamato, la desalilación produce el ácido carbámico correspondiente. Este se descarboxila de manera espontánea para producir un hemiaminal que se hidroliza para efectuar la disociación del conector. Los mecanismos químicos correspondientes operan con el tiocarbamato o carbonatos análogos para generar compuestos que contienen residuos de estructura $^*C(NH_2)-X^*$. Éstos colapsan mediante hidrólisis y disocian a su vez el conector.

Por solución acuosa se entiende en la presente un líquido que comprende al menos 20% en volumen, preferiblemente al menos 50%, por ejemplo al menos 75% en volumen, particularmente al menos 95% en volumen y especialmente más de 98% en volumen, idealmente 100% en volumen de agua como la fase continua.

20 Los metales de transición de uso en la formación de catalizadores descritos en la presente son preferiblemente platino, paladio, rodio, rutenio, osmio e iridio. Particularmente se prefiere paladio.

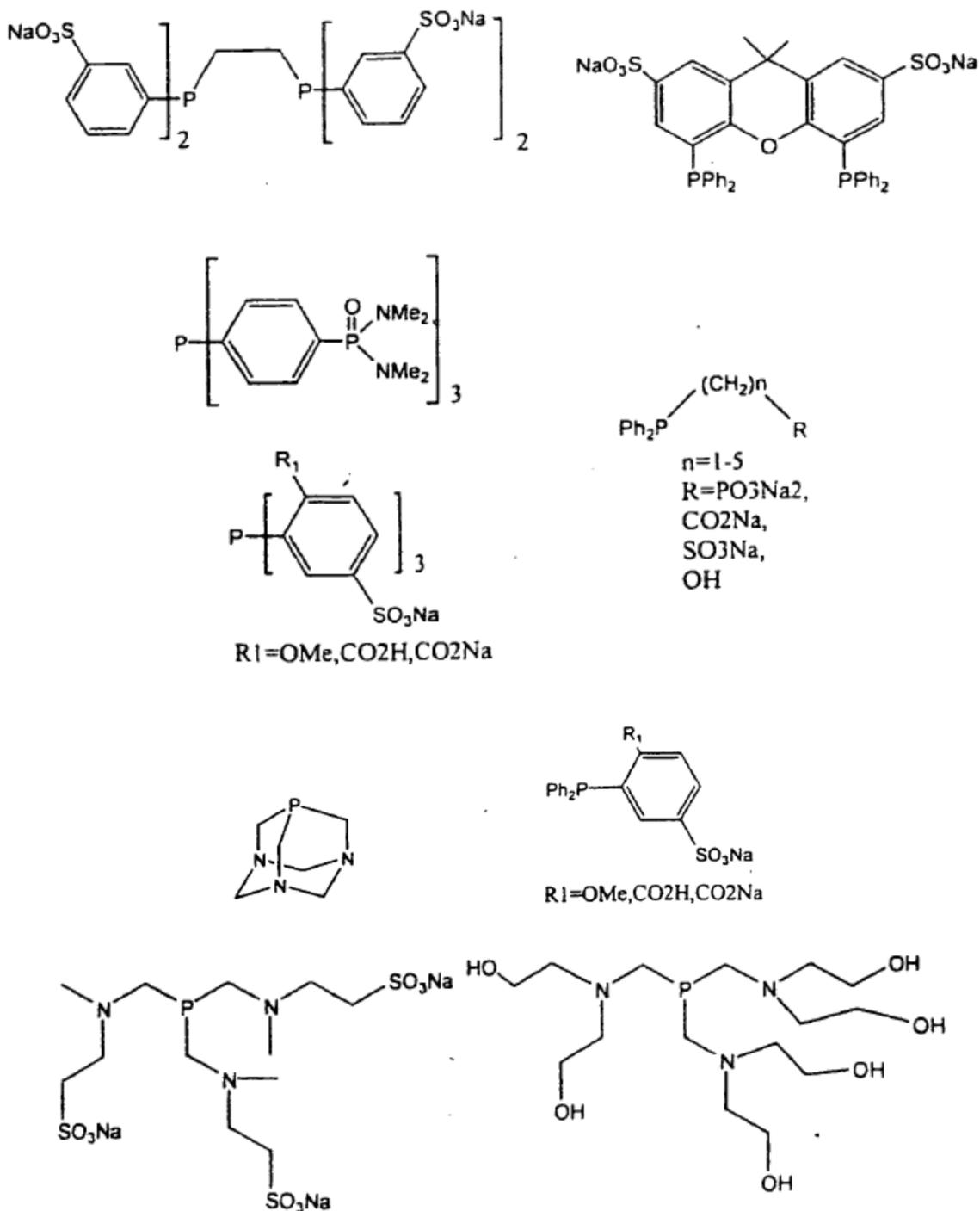
El metal de transición, por ejemplo paladio, se introduce de manera conveniente como una sal, por ejemplo como un haluro. También pueden usarse sales mixtas tales como Na_2PdCl_4 . Otras sales y compuestos apropiados serán fácilmente determinados por la persona experta y se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo en la Aldrich Chemical Company.

25 Las fosfinas adecuadas son cualquier fosfina o ligandos mixtos de nitrógeno-fosfina conocidos por las personas expertas en la técnica, caracterizados porque los ligandos se derivatizan de tal manera que los vuelven hidrosolubles, introduciendo por ejemplo uno o más residuos de sulfonato, amina, hidroxilo (preferiblemente una pluralidad de hidroxilos) o carboxilato. Cuando se encuentran presentes residuos de amina, las sales de amina pueden ayudar a la solubilización del ligando y de esta manera del complejo de metal-alilo. Los ejemplos de ligandos apropiados son triarilo-fosfina, por ejemplo trifenilfosfina, derivatizados para hacerlos hidrosolubles. También se prefieren tri-alkil fosfinas, por ejemplo tri-alkil de C_{1-6} -fosfinas tales como trietil-fosfina; tales trialkil fosfinas son igualmente derivatizadas para hacerlas hidrosolubles. Las fosfinas que contienen sulfonato y tienen carboxilato son particularmente preferidas; un ejemplo de las anteriores es 3,3',3"-fosfinidiotris (ácido bencenosulfónico) que se encuentra disponible comercialmente en la Aldrich Chemical Company como la sal trisódica; y un ejemplo preferido de esta última es tris(2-carboxietil)fosfina que se encuentra disponible en la Aldrich como la sal clorhidrato. Las fosfinas hidrosolubles derivatizadas y las fosfinas que contienen nitrógeno descritas en la presente pueden usarse como sus sales (por ejemplo como las sales clorhidrato de sodio) o, por ejemplo, en el caso de las fosfinas que contienen ácido sulfónico y ácido carboxílico descritas en la presente, como ácidos libres. De esta manera, puede introducirse 3,3',3"-fosfinidiotris (ácido bencenosulfónico) y tris(2-carboxietil)fosfinas como los triácidos o como las sales trisódicas. Otras sales apropiadas serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. La existencia en forma de sal no es particularmente importante siempre que las fosfinas sean solubles en solución acuosa.

Otras fosfinas que pueden usarse incluyen las siguientes:



Como la sal clorhidrato, compuesto neutro y la sal trisódica Como la sal clorhidrato, compuesto neutro y la sal trisódica



- 5 La persona experta será consciente de que los átomos quelados al metal de transición en el complejo hidrosoluble pueden ser parte de ligandos mono- o polidentados. Algunos de estos ligandos polidentados se han mostrado antes. Mientras que se prefieren ligandos monodentados, la invención también abarca de esta manera métodos que usan fosfinas hidrosolubles bi-, tri-, tetra-, penta- y hexadentados hidrosolubles y ligandos de fosfina hidrosolubles que contienen nitrógeno.
- 10 Como ya se ha señalado anteriormente, la solución acuosa en la cual se efectúa la desprotección no necesita estar al 100% (como la fase continua). Sin embargo, se prefiere agua pura (por ejemplo, al menos al 98% en volumen y de preferencia aproximadamente al 100% en volumen). Por lo general no se requieren co-solventes. Por lo general, los nucleótidos y nucleósidos son fácilmente solubles en agua (por ejemplo agua pura) en la cual puede efectuarse la disociación del enlace descrito en la presente. Si se desea pueden emplearse uno o más co-solventes miscibles con agua. Los solventes apropiados incluyen acetonitrilo o dimetilsulfóxido, metanol, etanol y acetona, y se prefiere metanol.
- 15 Los solventes menos preferidos incluyen tetrahidrofurano (THF) y dioxano.

En los métodos de disociación de residuos que contienen alilo de acuerdo con la invención se forma un complejo de metal soluble el cual comprende un metal de transición y uno o más ligandos de fosfina hidrosolubles (que incluyen ligandos hidrosolubles de fosfina que contienen nitrógeno). Puede usarse más de un tipo de fosfina hidrosoluble/ligando de fosfina que contienen nitrógeno en cualquier reacción dada aunque generalmente se usará sólo un tipo de estas clases de ligando en cualquier catalizador dado. La cantidad de metal de transición, por ejemplo paladio, puede ser de menos de 1% molar (calculado en relación con el número de moles de enlace que va a disociarse). De manera ventajosa, la cantidad de catalizador puede ser de mucho menos de 1% molar, por ejemplo <0.50 % molar, preferiblemente <0.10 % molar, particularmente <0.05% molar. Pueden usarse cantidades de metal incluso más bajas, por ejemplo <0.03 o incluso <0.01 % molar. Como estarán conscientes aquellos expertos en la técnica, a medida que se reduce la cantidad de catalizador también se disminuye la velocidad de la reacción. La persona experta será capaz de juzgar en cualquier caso una cantidad apropiada de metal de transición y de esta manera el catalizador adecuado para cualquier reacción particular.

En contraste con la cantidad de metal requerido para formar el catalizador activo, la cantidad utilizada de ligando(s) hidrosoluble(s) que contiene(n) fosfina es preferiblemente de más de 1 equivalente molar (nuevamente calculada en relación con el número de moles de enlace que van a disociarse). Preferiblemente pueden usarse más de 4, por ejemplo de más de 6, por ejemplo 8-12 equivalentes molares de ligando. Si se desea, pueden usarse cantidades incluso superiores de ligando, por ejemplo >20 equivalentes molares.

La persona experta podrá determinar la cantidad de ligando más adecuada a la reacción individual.

Cuando el enlace contiene un grupo azida, no es necesaria la presencia de un metal de transición para efectuar la disociación. De esta manera puede efectuarse la disociación de tales conectores en presencia solamente de las fosfinas discutidas en la presente; éstas pueden estar presentes en los métodos de la invención como sales hidrosolubles tales como aquellas discutidas en la presente.

Tal como se conoce en la técnica, un "nucleótido" consiste en una base nitrogenada, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En el ARN, el azúcar es una ribosa y en el ADN es una desoxirribosa, 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 adenosina (A) y guanidina (G) y las pirimidinas son citidina (C) y timidina (T) (o en el contexto de ARN, uracilo (U)). El átomo C-1 de la desoxirribosa está enlazado a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Un nucleótido también es un éster de fosfato de un nucleósido, y la esterificación ocurre en el grupo hidroxilo unido al C-5 del azúcar. Los nucleótidos son habitualmente mono, di- o trifosfatos.

Un "nucleósido" es estructuralmente similar a nucleótido pero le faltan los residuos fosfato. Un ejemplo de un nucleósido análogo sería uno en el cual la etiqueta está conectada con la base y no hay un grupo fosfato unido a la molécula de azúcar.

Aunque la base se denomina habitualmente una purina o pirimidina, el experto entenderá que están disponibles derivados y análogos que no alteran la capacidad del nucleótido o nucleósido de experimentar un emparejamiento de bases de Watson-Crick. "Derivado" o "análogo" significan un compuesto o a una molécula cuya estructura central es la misma, o se parece estrechamente, a la de un compuesto precursor, pero que tiene una modificación física o química, tal como un grupo lateral diferente o adicional, que permite al nucleótido o nucleósido derivado enlazarse a otra molécula. Por ejemplo, la base puede ser una desazapurina.

Los nucleótidos y nucleósidos modificados que se divulgan y se reivindican en la presente son ejemplos de tales derivados o análogos con la adición de etiquetas detectables conectadas a las bases por los conectores disociables que contienen alilo o azido descritos en la presente. De esta manera, se entenderá que los términos nucleótidos y nucleósidos, tal como se usan en este documento, incluyen tales nucleótidos y nucleósidos modificados.

Los derivados deben ser capaces de someterse a un emparejamiento de Watson-Crick. "Derivado" y "análogo" también significan a un derivado de nucleótido o nucleósido sintético que tienen residuos de base modificados y/o residuos de azúcar modificados. Tales derivados y análogos se discuten, por ejemplo, en Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley & Son, 1980) y Uhlman et al., Chemical Reviews 90: 543-584, 1990. Los análogos de nucleótidos también pueden comprender enlaces fosfodiéster modificados, que incluyen enlaces fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, fosforanilidato y fosforamidato. Los análogos deben ser capaces de someterse a emparejamiento de bases de Watson-Crick. "Derivado", "análogo" y "modificado", tal como se usan en la presente, pueden usarse de forma intercambiable y están comprendidos en los términos "nucleótido" y "nucleósido" definidos en la presente.

Los métodos de la presente invención hacen uso de etiquetas detectables convencionales. La detección puede realizarse por cualquier método adecuado, incluyendo espectroscopia de fluorescencia o por otro medio óptico. La etiqueta preferida es un fluoróforo, que, después de la absorción de energía, emite radiación a una longitud de onda definida. Se conocen muchas etiquetas fluorescentes adecuadas. Por ejemplo, Welch et al., (Chem. Eur. J. 5(3): 951-960, 1999) divulga residuos fluorescentes funcionalizados con dansilo que pueden usarse en la presente invención. Zhu et al., (Cytometry 28: 206-211, 1997) describe el uso de las etiquetas fluorescentes Cy3 y Cy5, que también pueden usarse en la presente invención. Etiquetas adecuadas para usar también se divulgan en Prober et al. (Science 238: 336-341, 1987); Connell et al. (BioTechniques 5(4): 342-384, 1987), Ansorge et al. (Nucl. Acids Res. 15(11): 4593-4602, 1987) y Smith et al. (Nature

321: 674, 1986). Otros etiquetas fluorescentes disponibles en el mercado incluyen, aunque no se limitan a, fluoresceína, rodamina, (incluyendo TMR, Texas red y Rox), alexa, bodipy, acridina, cumarina, pireno, benzantraceno y las cianinas.

5 En la invención también pueden usarse etiquetas múltiples. Por ejemplo, los casetes FRET con bi-fluoróforo (Tet. Letts. 46:8867-8871, 2000) son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse en la presente invención. También pueden usarse sistemas dendrímicos multi-flúor (J. Amer. Chem. Soc. 123: 8101-8108, 2001).

Aunque se prefieren etiquetas fluorescentes, otras formas de etiquetas detectables se entenderán como útiles para los especialistas. Por ejemplo, pueden usarse micropartículas, incluyendo puntos cuánticos (Empodocles, et al., Nature 399: 126-130, 1999), nanopartículas de oro (Reichert et al., Anal. Chem. 72: 6025-6029, 2000), microperlas (Lacoste et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(17): 9461-9466, 2000) y etiquetas detectables mediante espectrometría de masas.

10 En la invención también pueden usarse etiquetas multicomponentes. Una etiqueta multicomponente es una que depende de la interacción con otro compuesto para la detección. La etiqueta multicomponente más común que se utiliza en biología es el sistema de biotina-estreptavidina. La biotina se usa como la etiqueta unida a la base del nucleótido. La estreptavidina se añade después por separado para posibilitar que ocurra la detección. Están disponibles otros sistemas multicomponentes. Por ejemplo, dinitrofenol tiene un anticuerpo fluorescente disponible en el mercado que puede usarse para la detección.

15 La etiqueta (o el constructor de etiqueta y conector) puede tener un tamaño o una estructura suficiente para actuar como un bloqueo a la incorporación de otro nucleótido al nucleótido de la invención. Esto permite realizar polimerización controlada. El bloqueo puede deberse a un impedimento estérico o puede deberse a una combinación de tamaño, carga y estructura.

20 La invención se describirá adicionalmente, de manera principal, con referencia a nucleótidos. Sin embargo, a menos que se indique algo diferente, las referencias en la presente a los nucleótidos también están destinadas a ser aplicables a los nucleósidos. La invención también se describirá adicionalmente con referencia a ADN, aunque la descripción también será aplicable a ARN, a ANP y a otros ácidos nucleicos, a menos que se indique de otro modo.

25 Los nucleótidos modificados de la invención usan un conector disociable para unir la etiqueta al nucleótido. El uso de un conector disociable asegura que la etiqueta puede retirarse, si se requiere, después de la detección, por lo cual se impide cualquier señal interferente con cualquier nucleótido etiquetado incorporado posteriormente.

El uso del término "conector disociable" no quiere decir que implique que se requiera retirar todo el conector de la base de nucleótido. El sitio de disociación puede localizarse en una posición sobre el conector que asegure que parte del conector permanezca unida a la base del nucleótido después de disociación.

30 El conector puede unirse en cualquier posición en la base de nucleótido siempre que todavía pueda realizarse el emparejamiento de bases de Watson-Crick. En el contexto de las bases de purina se prefiere que el conector se una por la posición 7 de la purina o el análogo desazapurina preferido, por una purina modificada en 8, por una adenosina modificada en N-6 o una guanina modificada en N-2. Para pirimidinas, la unión es preferiblemente por la posición 5 en la citidina, timidina o uracilo y la posición N-4 en la citosina. Se muestran estructuras de nucleótido adecuadas 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 pueden seleccionarse de H, OH o cualquier grupo que pueda transformarse en un OH, incluyendo, aunque sin limitación, un carbonilo.

35 Los conectores adecuados comprenden los residuos que contienen azida y alilo que se han discutido anteriormente. Sin embargo, además de estos residuos disociables, otros motivos disociables también pueden, por supuesto, estar presentes en los conectores. Con referencia a la Figura 2, los ejemplos de los mismos incluyen, aunque sin limitación, conectores de disulfuro (1), residuos lábiles de ácidos (2, 3, 4 y 5; incluyendo residuos dialcoxibencilo (por ejemplo, 2), conectores Sieber (por ejemplo, 3), residuos indol (por ejemplo, 4), residuos Sieber de t-butilo (por ejemplo, 5), residuos disociables electrofílicamente, residuos escindibles nucleofílicamente, residuos fotodisociables, disociación en condiciones reductoras, condiciones oxidantes, disociación mediante el uso de residuos de cierre de seguridad y disociación por mecanismos de eliminación. Los ejemplos de dichos residuos se describen en el documento WO03/048387.

40 Así como el residuo disociable por fosfinas hidrosolubles o catalizadores a base de metales de transición descritos en la presente, los enlaces disociables también pueden comprender una unidad espaciadora. El espaciador separa la base de nucleótido del lugar de disociación o etiqueta. La longitud del residuo es irrelevante siempre que la etiqueta se mantenga a una distancia suficiente del nucleótido para no interferir con ninguna interacción entre el nucleótido y una enzima.

45 Tales grupos espaciadores pueden contener uno o más grupos arílicos, por ejemplo, fenileno, en la cadena (es decir, un residuo -Ar- donde el anillo de fenilo es parte del conector por medio de sus átomos de carbono dispuestos en 1,4, 1,3 ó 1,2). El anillo de fenilo puede estar 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 acepción de electrones es por inducción o resonancia. Un ejemplo de un grupo aceptor de electrones por resonancia es nitro; un grupo que actúa mediante inducción es fluoro. El experto será consciente de otros grupos aceptores de electrones

apropiados. El enlace en el grupo R' también puede incluir residuos tales como un -O-, -SeO_q, donde q es 0, 1 o 2 o NH o N-alquilo.

5 Los nucleótidos modificados pueden comprender también grupos adicionales o modificaciones en el grupo azúcar. Por ejemplo, un derivado de didesoxirribosa, que carece de ambos grupos hidroxilo en la estructura de anillo de ribosa (en las posiciones 2' y 3'), puede prepararse y usarse como un bloqueo para la incorporación adicional de nucleótido en una cadena oligonucleotídica creciente. El grupo protector tiene por objeto evitar la incorporación en una hebra polinucleotídica emergente y puede eliminarse en condiciones definidas para permitir que ocurra la polimerización. En contraste con la técnica anterior, no es necesario que haya etiqueta detectable unida en la posición 3' de la ribosa. Esto permite que se reduzca el impedimento estérico con la enzima polimerasa, mientras que todavía se permite el control de la incorporación usando el grupo protector.

10 La persona experta valorará cómo unir un grupo protector adecuado al anillo de ribosa para bloquear interacciones con el OH 3'. El grupo protector puede unirse directamente a la posición 3' o puede unirse a la posición 2' (y el grupo protector es de suficiente tamaño o carga para bloquear interacciones en la posición 3'). Alternativamente, el grupo protector puede unirse tanto en la posición 3' como 2' y puede disociarse para exponer el grupo OH 3'.

15 Los grupos protectores adecuados serán evidentes para la persona experta y pueden formarse a partir de cualquier grupo protector adecuado descrito en "Protective Groups in Organic Synthesis", T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3a Ed., Wiley Interscience, New York. El grupo protector debe poder eliminarse (o ser modificable) para producir un grupo OH 3'. El proceso usado para obtener el grupo OH 3' puede ser cualquier reacción química o enzimática adecuada.

Preferiblemente, el grupo de bloqueo o protector es un grupo alilo o un grupo de la estructura

20
$$-O-Z$$

En el que 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 el que cada R'' es o es parte de un grupo protector que puede eliminarse;

25 cada R' es independientemente un átomo de hidrogeno, un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alqueno, aquinilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, acilo, ciano, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi o amido; o (R')₂ representa un grupo alquilideno de fórmula $=C(R'')_2$ en el que cada R'' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y

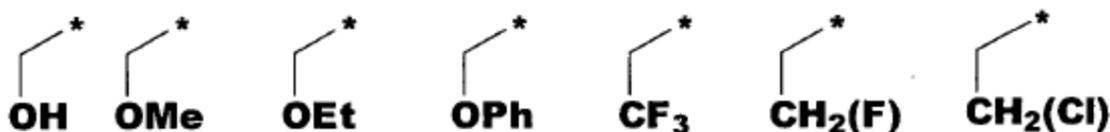
en el que dicha molécula puede hacerse reaccionar para producir un intermedio en el cual cada R'' es intercambiado por H o, cuando Z es $-C(R')_2-F$, el F es intercambiado por OH, SH o NH₂, preferiblemente OH, dicho intermedio se disocia en condiciones acuosas para producir una molécula con un OH 3' libre;

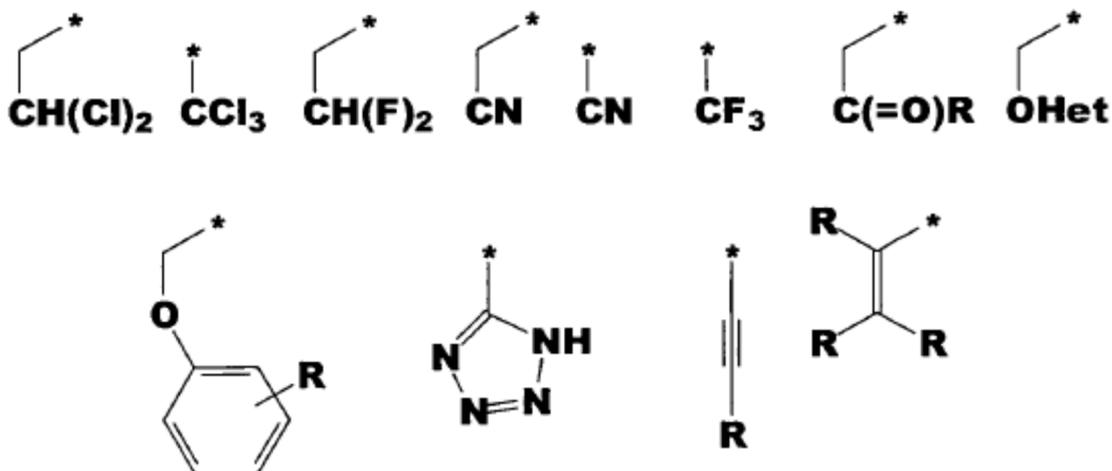
30 con la condición de que cuando Z es $-C(R')_2-S-R''$, ambos grupos R' no son H.

Cuando el grupo de bloqueo es un grupo alilo, el mismo puede introducirse en la posición 3' usando procedimientos estándar de la bibliografía tales como los que usados por Metzker (Nucleic Acids Research, 22(20):4259-4267, 1994).

35 Los intermedios producidos ventajosamente, espontáneamente se disocian en condiciones acuosas de vuelta a la estructura natural de hidroxilo 3', lo que permite la incorporación adicional de otro nucleótido. Puede usarse cualquier grupo protector adecuado. Preferiblemente, Z es de fórmula $-C(R')_2-O-R''$, $-C(R')_2-N(R'')_2$, $-C(R')_2-N(H)R''$ y $-C(R')_2-SR''$. De modo particularmente preferible, Z es de la fórmula $-C(R')_2-O-R''$, $-C(R')_2-N(R'')_2$, y $-C(R')_2-SR''$. R'' puede ser un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido.

40 Un ejemplo de grupos de estructura $-O-Z$ en los que Z es $-C(R')_2-N(R'')_2$ son aquellos en los que $-N(R'')_2$ es azido ($-N_3$). Un ejemplo preferido de este tipo es azidometilo en el que cada R' es H. De modo alternativo, R' en grupos Z de fórmula $-C(R')_2-N_3$ y otros grupos Z puede ser cualquiera de los otros grupos discutidos en la presente. Ejemplos de grupos típicos R' incluye un alquilo de C₁₋₆, particularmente metilo y etilo y los siguientes (en los que cada estructura muestra el enlace que conecta el residuo R' con el átomo de carbono al cual éste se une en los grupos Z; los asteriscos (*) indican los puntos de unión):





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

10 Cuando las moléculas contienen grupos Z de fórmula C(R')₂N₃, el grupo azido puede convertirse en amino poniendo en contacto tales moléculas con la fosfina o los ligandos de fosfina que contienen nitrógeno descritos detalladamente en conexión con los complejos de metal de transición que sirven para disociar los grupos alilo de los compuestos de fórmula PN-O-alilo, fórmula R-O- alilo, R₂N(alilo), RNH(alilo), RN(alilo)₂ y R-S-alilo. Cuando se transforma azido en amino, no obstante, no es necesario un metal de transición. De manera alternativa, el grupo azido en los grupos Z de fórmula C(R')₂N₃ puede convertirse en amino poniendo en contacto tales moléculas con los tioles, en particular tioles hidrosolubles tales como ditiotretol (DTT).

20 El conector lábil puede consistir, y preferiblemente consiste, en una funcionalidad disociable en condiciones idénticas a las de bloqueo. Esto hace el procedimiento de desprotección más eficiente puesto que se requerirá solo un tratamiento para disociar tanto la etiqueta como el bloqueo. Por ejemplo, cuando el enlace contiene un residuo alilo, tal como se ha discutido y reivindicado en la presente, y el grupo de bloqueo es un grupo alilo, tanto el enlace como el grupo de bloqueo serán disociables en condiciones idénticas. De manera similar, si el enlace contiene un residuo azido tal como se ha discutido y reivindicado en la presente y el grupo de bloqueo comprende un residuo azido, es por ejemplo de fórmula Z en la cual R" es N₃ tal como se ha discutido previamente, tanto el enlace como el grupo de bloqueo serán disociables en condiciones idénticas. Por supuesto el grupo de bloqueo puede desprotegerse en condiciones químicas completamente diferentes de aquellas requeridas para disociar el conector.

25 El término "alquilo" cubre grupos alquilo tanto de cadena recta como de cadena ramificada. A menos que el contexto indique algo diferente, el término "alquilo" se refiere a grupos que tienen 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo 1 a 8 átomos de carbono, y de manera típica de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 4 átomos de carbono. 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.

30 Son ejemplos de grupos cicloalquilo aquellos que tienen de 3 a 10 átomos en el anillo, y los ejemplos particulares incluyen aquellos derivados de ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano y cicloheptano, bicicloheptano y decalina.

35 Cuando los grupos alquilo (incluyendo cicloalquilo) están sustituidos, particularmente cuando estos forman ambos grupos R' de las moléculas de la invención, los ejemplos de sustituyentes apropiados incluyen sustituyentes de halógeno o grupos funcionales tales como hidroxilo, amino, ciano, nitro, carboxilo y similares. Tales grupos también pueden ser sustituyentes, cuando sea apropiado, de los demás grupos R' en las moléculas de la invención.

Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo), 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), isopropenilo, butenilo, buta-1,4-dienilo, pentenilo y hexenilo.

Ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo y ciclohexenilo.

El término alcoxi se refiere a alcoxi de C₁₋₆ a menos que se indique algo diferente: -OR, donde R es un grupo de alquilo de C₁₋₆. Ejemplos de grupos Alcoxi de C₁₋₆ incluyen, pero no se limitan a, -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (sec-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi), y -O(tBu) (ter-butoxi).

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

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

Los métodos de secuenciación de ADN, tales como los resumidos en la patente estadounidense No. 5,302,509 pueden llevarse a cabo usando el nucleótido.

10 Preferiblemente, los constructos de nucleótidos modificados, bloqueados y etiquetados de las bases de nucleótido 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 puede ponerse en contacto con la diana secuencialmente, con el retiro de los nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido, cuando la detección y el retiro de la etiqueta y del grupo de bloqueo, si están presentes, se lleva a cabo después de la adición de cada nucleótido o después de la adición de todos los cuatro nucleótidos.

15 En los métodos, todos los nucleótidos pueden ponerse en contacto con la diana simultáneamente, es decir, una composición que comprende todos los diferentes nucleótidos se pone en contacto con la diana y los nucleótidos no incorporados se retiran antes de la detección y posteriormente al retiro de la etiqueta y el grupo de bloqueo, si están presentes.

20 Los cuatro nucleótidos, uno de los cuales será complementario a la primera base no apareada en el polinucleótido diana, pueden ponerse en contacto con la diana secuencialmente, opcionalmente con retiro de nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido. La determinación del éxito de la incorporación puede realizarse después de proporcionar cada nucleótido o después de adicionar todos los nucleótidos añadidos. Si se determina después de la adición de menos de cuatro nucleótidos que uno ha sido incorporado, no es necesario proporcionar nucleótidos adicionales para detectar los nucleótidos complementarios al nucleótido incorporado.

25 Alternativamente, todos los nucleótidos pueden ponerse en contacto simultáneamente con la diana, 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 la diana y los nucleótidos no incorporados se retiran antes de la detección y retiro de la(s) etiqueta(s). 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 se proporciona una composición que comprende uno, dos o tres de los
30 cuatro nucleótidos posibles, es decir, se pone en contacto con la diana. Después de esto, cualquier nucleótido no incorporado puede retirarse y puede llevarse a cabo una etapa de detección para determinar si se ha incorporado uno de los nucleótidos. Si se ha incorporado uno, puede efectuarse la disociación del conector y, si es necesario, puede introducirse después una funcionalidad amida terminal en el brazo colgante. De este modo puede determinarse la identidad de un nucleótido en el polinucleótido diana. El polinucleótido emergente puede prolongarse después para
35 determinar la identidad del siguiente nucleótido no apareado en el oligonucleótido diana.

Si la primera subetapa anterior no conduce a la incorporación de un nucleótido o si éste no se conoce, ya que la presencia de nucleótidos incorporados no se busca inmediatamente después de la primera subetapa, pueden realizarse una o más subetapas posteriores en las que se proporcionan alguno o todos de los nucleótidos no proporcionados en la primera subetapa, cuando sea apropiado, simultáneamente o posteriormente. Después de esto, puede retirarse cualquier
40 nucleótido no incorporado y puede llevarse a cabo una etapa de detección para determinar si se ha incorporado alguna de las clases de nucleótidos. Si ha sido incorporada una, puede efectuarse la disociación del conector y, si es necesario, como una etapa o etapas adicionales, puede introducirse una funcionalidad amida terminal en el brazo colgante. De este modo puede determinarse la identidad de un nucleótido en el polinucleótido diana. El polinucleótido emergente puede prolongarse después para determinar la identidad del siguiente nucleótido no apareado en el oligonucleótido diana. Si es
45 necesario, puede efectuarse una tercera y opcionalmente una cuarta subetapa de manera similar a la segunda subetapa. Obviamente, una vez han sido efectuadas las cuatro subetapas, habrán sido proporcionados todos los cuatro nucleótidos posibles y uno habrá sido incorporado.

Es deseable determinar si un tipo o clase de nucleótido ha sido incorporado después de que haya sido proporcionada cualquier combinación particular que comprende uno, dos o tres nucleótidos. De este modo se obvia el coste innecesario
50 y el tiempo consumido en proporcionar el (los) otro(s) nucleótido(s). Nuevamente, esto no es una característica requerida de la invención. Obviamente, es necesario que al menos alguno de los nucleótidos no incorporados y, preferiblemente tantos como sea practicable, se retiren antes de la detección del nucleótido incorporado.

Un método para determinar la secuencia de un polinucleótido diana puede realizarse poniendo en contacto el
55 polinucleótido diana por separado con los diferentes nucleótidos para formar el complemento al del polinucleótido diana y detectando la incorporación de los nucleótidos. Un método de este tipo hace uso de la polimerización, por la que una

enzima polimerasa prolonga la hebra complementaria incorporando el nucleótido correcto complementario al de la diana. La reacción de polimerización también requiere un cebador específico para iniciar la polimerización.

5 Para cada ciclo, la enzima polimerasa realiza la incorporación del nucleótido modificado y después se determina el evento de incorporación. Existen muchas polimerasas diferentes y para la persona de habilidad ordinaria será evidente cuál es la más apropiada para usar. Las enzimas preferidas incluyen ADN polimerasa I, el fragmento de Klenow, ADN polimerasa III, ADN polimerasa de T4 o T7, Polimerasa de Taq o Polimerasa de Vent. También pueden usarse polimerasas diseñadas para tener propiedades específicas. Preferiblemente, la molécula se incorpora por una polimerasa y particularmente de *Thermococcus* sp., tal como 9°N. Incluso más preferiblemente, la polimerasa es un mutante 9°N A485L y aún más preferiblemente, es un doble mutante Y409V y A485L. Un ejemplo de una enzima preferida de este tipo es *Thermococcus* sp. 9°N exo -Y409V A485L disponible en New England Biolabs. Los ejemplos de tales polimerasas apropiadas se divulgan en *Prac. 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.

15 Aquellos con habilidad en la técnica estarán conscientes de la utilidad de los didesoxinucleósidos trifosfatos en los denominados métodos de secuenciación de Sanger y protocolos relacionados (de tipo Sanger), que dependen de una terminación de cadena aleatorizada en un tipo particular de nucleótido. Un ejemplo de un protocolo de secuenciación de tipo Sanger es el método BASS descrito por Metzker (más adelante). Los versados en la técnica conocerán otros métodos de secuenciación de tipo Sanger.

20 Los métodos Sanger o de tipo Sanger generalmente funcionan mediante la realización de un experimento en el que se proporcionan ocho tipos de nucleótidos, cuatro de los cuales contienen un grupo OH 3' y cuatro de los cuales omiten el grupo OH y que están etiquetados de modo distinto entre sí. Los nucleótidos usados que omiten el grupo 3' OH - didesoxi nucleótidos - se abrevian convencionalmente como ddNTP. Tal como la persona experta conoce, ya que los ddNTP están etiquetados de modo distinto, determinando las posiciones de los nucleótidos terminales incorporados y combinando esta información, puede determinarse la secuencia del oligonucleótido diana.

25 Se reconocerá que los nucleótidos de la presente invención en los que el grupo OH 3' está ausente o bloqueado pueden ser de utilidad en métodos Sanger y protocolos relacionados ya que el mismo efecto conseguido usando ddNTP puede conseguirse usando grupos de bloqueo de OH 3': ambos evitan la incorporación de posteriores nucleótidos.

El uso de los nucleótidos de acuerdo con la presente invención en métodos de secuenciación Sanger o de tipo Sanger forma un aspecto adicional más de esta invención. Visto desde ese aspecto, la invención proporciona el uso de tales nucleótidos en un método de secuenciación Sanger o tipo Sanger.

30 Los métodos de secuenciación se realizan preferiblemente con el polinucleótido diana dispuesto sobre un soporte sólido. Mediante moléculas conectoras pueden inmovilizarse múltiples polinucleótidos diana en el soporte sólido o también se pueden unir a partículas, por ejemplo, microesferas, que también pueden unirse a un material de soporte sólido.

35 Los polinucleótidos pueden unirse al soporte sólido por una cantidad de medios, incluyendo el uso de interacciones avidina-biotina. Los métodos para la inmovilización de polinucleótidos sobre un soporte sólido se conocen bien en la técnica e incluyen técnicas litográficas y "localizar" polinucleótidos individuales en posiciones definidas sobre un soporte sólido. Se conocen soportes sólidos adecuados en la técnica e incluyen portaobjetos de vidrio y perlas, superficies de cerámica y silicio y materiales plásticos. El soporte es habitualmente una superficie plana aunque también pueden usarse perlas microscópicas (microesferas) y pueden unirse, a su vez, a otro soporte sólido por medios conocidos. Las microesferas pueden ser de cualquier tamaño adecuado, típicamente en el intervalo de 10 a 100 nm de diámetro. En una realización preferida, los polinucleótidos se unen directamente sobre una superficie plana, preferiblemente una superficie plana de vidrio. La unión será preferiblemente mediante un enlace covalente. Preferiblemente, las matrices que se usan son matrices de una sola molécula que comprenden polinucleótidos en distintas áreas separables ópticamente, por ejemplo, tal como se divulga en la Solicitud Internacional N° WO 00/06770.

45 El método de secuenciación puede realizarse tanto en matrices de una sola molécula de polinucleótido o de moléculas de multipolinucleótidos, es decir, matrices de moléculas individuales de polinucleótidos, distintas, y matrices de regiones distintas que comprenden copias múltiples de una molécula individual de polinucleótido. Las matrices de una sola molécula permiten que cada polinucleótido individual tenga una resolución por separado. Se prefiere el uso de matrices de una sola molécula. La secuenciación de manera no destructiva de matrices de una sola molécula permite que se forme una matriz espacialmente dirigida.

50 El método hace uso de la reacción de polimerización para generar la secuencia complementaria de la diana. Para la persona experta estarán claras las condiciones compatibles con reacciones de polimerización.

55 Para realizar la reacción de la polimerasa habitualmente será necesario hibridar primero una secuencia de cebador con el polinucleótido diana, y la secuencia de cebador es reconocida por la enzima polimerasa y actúa como un sitio de inicio para la prolongación posterior de la hebra complementaria. La secuencia de cebador puede añadirse como un componente separado con respecto al polinucleótido diana. Alternativamente, el cebador y el polinucleótido diana pueden ser cada uno parte de una molécula monocatenaria, y la porción de cebador forma un dúplex intramolecular con una parte

de la diana, es decir, una estructura de bucle en horquilla. Esta estructura puede inmovilizarse en el soporte sólido en cualquier punto de la molécula. Para las personas expertas en la técnica serán evidentes otras condiciones necesarias para realizar la reacción de la polimerasa, que incluyen temperatura, pH, composiciones reguladoras de pH, etc.

5 Los nucleótidos modificados de la invención se ponen después en contacto con el polinucleótido diana, para permitir que ocurra la polimerización. Los nucleótidos pueden añadirse secuencialmente, es decir, adición separada de cada tipo de nucleótido (A, T, G o C) o añadirse conjuntamente. Si se añaden juntos, es preferible que cada tipo de nucleótido se etiquete con una etiqueta diferente.

Se deja proceder esta etapa de polimerización durante un tiempo suficiente para permitir la incorporación de un nucleótido.

10 Los nucleótidos que no se incorporan, se retiran después, por ejemplo, sometiendo la matriz a una etapa de lavado y después puede realizarse la detección de las etiquetas incorporadas.

15 La detección puede ser por medios convencionales, por ejemplo, si la etiqueta es un residuo fluorescente, la detección de una base incorporada puede realizarse usando un microscopio de barrido confocal para explorar la superficie de la matriz con un láser, para captar imágenes de un enlace de fluoróforo enlazado directamente a la base incorporada. Alternativamente, puede usarse un detector sensible 2-D, tal como un detector acoplado por carga (CCD), para visualizar las señales individuales generadas. Sin embargo, están disponibles otras técnicas como la microscopía óptica de barrido de campo cercano (SNOM) y pueden usarse cuando se captan imágenes de matrices densas. Por ejemplo, usando SNOM, los polinucleótidos individuales pueden distinguirse cuando están separados por una distancia de menos de 100 nm, por ejemplo, de 10 nm a 10 μ m. Para una descripción de microscopía óptica de barrido de campo cercano, véase Moyer et al., Laser Focus World 29: 10, 1993. Se conocen aparatos adecuados que se usan para captar imágenes de matrices de polinucleótidos y su puesta en marcha técnica será evidente para la persona experta.

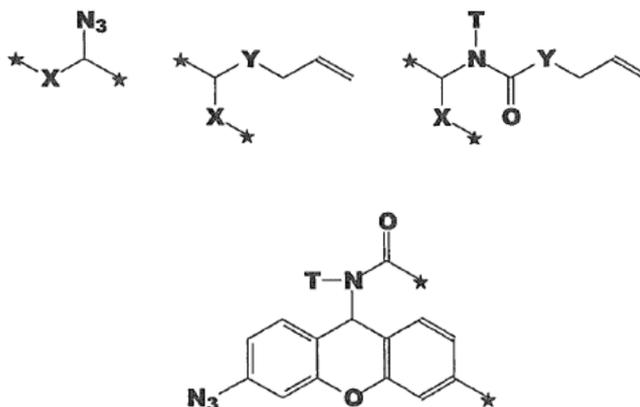
20

Después de la detección, la etiqueta puede retirarse usando condiciones adecuadas que disocian el conector.

25 El uso de los nucleótidos modificados no está limitado a técnicas de secuenciación de ADN y también pueden realizarse otras técnicas, que incluyen síntesis de polinucleótidos, ensayos de hibridación de ADN y estudios de polimorfismo de un solo nucleótido, usando los nucleótidos de la invención. Cualquier técnica que implique la interacción entre un nucleótido y una enzima puede usar las moléculas de la invención. Por ejemplo, la molécula puede usarse como un sustrato para una enzima transcriptasa inversa o transferasa terminal.

Otros aspectos pueden incluir lo siguiente:

1. Un nucleótido o un nucleósido que tienen una base unida a una etiqueta detectable a través de un conector disociable, caracterizado porque el conector disociable contiene un residuo seleccionado del grupo que comprende:



30

(en el cual X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, Y se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y N(alilo), T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indican donde se conecta el residuo con el resto del nucleótido o nucleósido).

35

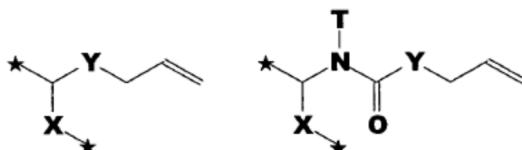
2. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con 1 en los que X es O o S.

3. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con 1 o 2 en los que Y es O o S.

4. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 3 en los que Y i O.

5. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 4 en los que el residuo puede estar presente en el nucleótido o nucleósido en cualquiera de dos orientaciones.

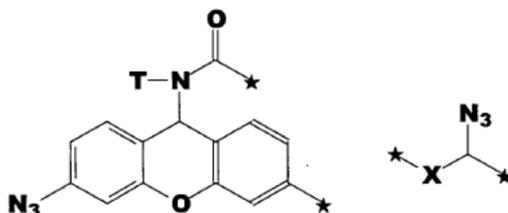
6. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 5 en los cuales la base es una purina o una pirimidina.
7. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 6 en los cuales el conector está unido a la posición 5 de una pirimidina o a la posición 7 de una purina.
8. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 7 en los cuales la base es una desazapurina.
- 5 9. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 8 en los cuales el nucleótido tiene un residuo de azúcar ribosa o desoxirribosa.
10. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con 9 en los cuales el azúcar ribosa o desoxirribosa comprende un grupo protector hidroxilo unido al átomo de oxígeno 2' o 3'.
- 10 11. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con 10 en los cuales pueden usarse las mismas condiciones químicas para efectuar la disociación del conector disociable y para retirar el grupo protector hidroxilo.
12. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 11 en los cuales el nucleótido es un desoxirribonucleótido trifosfato.
13. El nucleótido o nucleósido de acuerdo con cualquiera de 1 a 12 en los cuales la etiqueta detectable es un fluoróforo.
14. Un oligonucleótido que comprende uno o más nucleótidos tal como se han definido en cualquiera de 1 a 13.
- 15 15. El oligonucleótido de acuerdo con 14 en el cual al menos un nucleótido está presente en una posición terminal en dicho oligonucleótido.
16. Un método de disociación de un conector que contiene un residuo seleccionado de los grupos que comprenden:



- 20 (en los cuales X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, Y se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y N(alilo), T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indican donde se conecta el residuo al resto de un nucleótido o nucleósido),

y dicho conector está presente en un nucleótido o nucleósido y conecta la base de los mismos con una etiqueta detectable; dicho método comprende poner en contacto el nucleótido o nucleósido con un catalizador de metal de transición a base de fosfina, hidrosoluble.

- 25 17. El método de acuerdo con 16 en el cual el metal de transición se selecciona del grupo que comprende platino, paladio, rodio, rutenio, osmio e iridio
18. El método de acuerdo con 16 en el cual el metal de transición es paladio.
19. Un método para disociar un conector que contiene un residuo seleccionado de los grupos que comprenden:

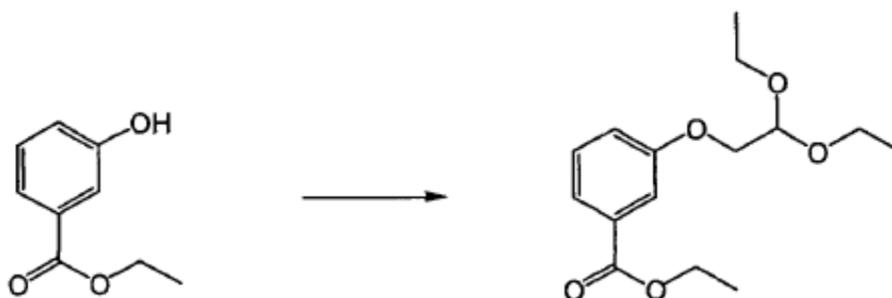


- 30 (en los cuales X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ donde Q es un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido, T es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido y * indica donde se conecta el residuo con el resto de un nucleótido o nucleósido),

y dicho conector está presente en un nucleótido o nucleósido y conecta la base del mismo con una etiqueta detectable; dicho método comprende poner en contacto el nucleótido o nucleósido con una fosfina hidrosoluble.

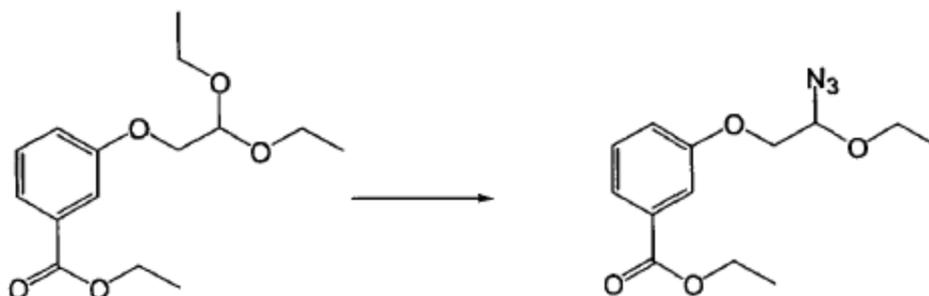
20. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 19 en el cual dicha fosfina es una triaril fosfina derivatizada o una triaril fosfina derivatizada.
21. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 20 en el cual dicha fosfina es una triaril fosfina derivatizadas con una o más funcionalidades seleccionadas del grupo que comprende amino, hidroxilo, carboxilo y sulfonato.
- 5 22. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 21 en el cual la fosfina hidrosoluble se selecciona del grupo que comprende 3,3',3"-fosfinidinetris (ácido bencenosulfónico) o tris(2-carboxietil)fosfina y sus sales.
23. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 19 en el cual dicha fosfina contiene uno o más átomos de nitrógeno.
24. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 23 en el cual X es O o S.
25. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 24 en el cual Y es O o S.
- 10 26. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 25 en el cual Y es O.
27. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 26 en el cual los residuos pueden estar presentes en el nucleósido o nucleótido en cualquiera de dos orientaciones.
28. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 27 en el cual dicha etiqueta se detecta antes que dicho conector se disocie.
- 15 29. El método de 28 en el cual dicho método implica disociación del conector en un nucleótido que se incorpora a un oligonucleótido.
30. El método de 29 en el cual dicho nucleótido incorporado está presente en una posición terminal en dicho oligonucleótido.
31. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 30 en el cual la base es una purina o una pirimidina.
- 20 32. El método de 31, en el cual el conector se une a la posición 5 de una pirimidina o a la posición 7 de una purina.
33. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 32 en el cual la base es una desazapurina.
34. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 33 en el cual el nucleótido tiene un residuo de azúcar ribosa o desoxirribosa.
- 25 35. El método de 34 en el cual el azúcar ribosa o desoxirribosa comprende un grupo de protección de hidroxilo unido al átomo de oxígeno 2' o 3'.
36. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 35 en el cual el nucleótido es un deoxiribonucleótido trifosfato.
37. El método de acuerdo con cualquiera de 16 a 36 en el cual la etiqueta detectable es un fluoróforo.
38. El método de acuerdo con cualquiera de 29 a 37 en el cual la etapa de incorporación se efectúa por una transcriptasa inversa, una transferasa terminal o una polimerasa.
- 30 39. El método de 38 en el cual la polimerasa es un Thermococcus sp.
40. El método de 39 en el cual el Thermococcus sp es 9°N o un único mutante o un votante doble del mismo.
41. El método de 40 en el cual el mutante doble es - Y409V A485L.
42. El método de acuerdo con cualquiera de 29 a 41 en el cual la etiqueta detectable y/o el conector disociable son de un tamaño suficiente para impedir la incorporación de un nucleótido subsiguiente al oligonucleótido emergente.
- 35 43. El método de acuerdo con cualquiera de 29 a 42 en el cual el nucleótido incorporado contiene un grupo de bloqueo OH 3' que sirve para impedir la incorporación de cualquier otro nucleótido.
44. El método de 43 en el cual las mismas condiciones químicas usadas para efectuar la disociación del conector disociable sirven para retirar el grupo de bloqueo OH 3'.
- 40 45. El método de acuerdo con cualquiera de 29 a 44 en el cual el paso de detección permite la identificación del nucleótido incorporado.
46. Un método para determinar la identidad de un nucleótido en un polinucleótido monocatenario diana, el cual comprende:

- (a) proporcionar uno o más de los nucleótidos A, G, C y T o U en los cuales cada uno de dichos nucleótidos tiene una base que se une a etiqueta detectable marcada por medio de un conector y dicho conector es disociable con una fosfina hidrosoluble; y polinucleótido emergente complementario al polinucleótido diana; uno de dichos nucleótidos proporcionados es adecuado para incorporación a dicho polinucleótido emergente;
- 5 (b) incorporar el nucleótido adecuado para incorporación a dicho polinucleótido emergente; y
- (c) llevar a cabo un método tal como fue definido en la reivindicación 45.
47. El método de 46 en el cual los pasos (a) y (b) se repiten una o más veces para determinar la identidad de una pluralidad de bases en el polinucleótido diana.
- 10 48. Un método de acuerdo con 46 o 47 en el cual el paso (a) comprende poner en contacto secuencialmente los nucleótidos proporcionados con la diana.
49. Un método de acuerdo con cualquiera de 46 a 48 en el cual la etapa (a) comprende al menos una subetapa de proporcionar uno de los cuatro nucleótidos dichos.
50. Un método de 49 en el cual la etapa (a) comprende además, después de dicha subetapa, proporcionar los otros tres nucleótidos de manera simultánea o secuencial.
- 15 51. Un método de 50 en el cual dichos otros tres nucleótidos se adicionan secuencialmente, ya sea proporcionándolos uno a la vez; o dos simultáneamente y luego el restante; o uno de los tres y luego los restantes dos simultáneamente.
52. Un método de acuerdo con cualquiera de 46 a 48 en el cual la etapa (a) comprende al menos una subetapa de proporcionar dos de los cuatro nucleótidos dichos.
- 20 53. Un método de 52 en el cual la etapa (a) comprende además, después de dicha subetapa, proporcionar los otros dos nucleótidos de modo simultáneo o secuencial.
54. Un método de acuerdo con cualquiera de 46 a 48 en el cual la etapa (a) comprende al menos una subetapa de proporcionar tres de los cuatro nucleótidos dichos.
55. Un método de 54 en el cual la etapa (a) comprende además, después de dicha sub etapa, proporcionar el nucleótido restante de los cuatro nucleótidos dichos.
- 25 56. Un método de acuerdo con cualquiera de 46 a 48 en el cual la etapa (a) comprende proporcionar todos los cuatro nucleótidos dichos y ponerlos en contacto con la diana simultáneamente.
57. Un método de acuerdo con cualquiera de 46 a 56 en el cual se retira cualquier nucleótido no incorporado antes de proporcionar otro(s) nucleótido(s) y/o de efectuar el paso (c).
- 30 58. Un método de 57 en el cual la etapa (c) se efectúa sin nucleótidos inapropiados que han sido proporcionados después de proporcionar dicho nucleótido adecuado.
59. Uso de un nucleótido tal como se ha definido en cualquiera de 1 a 13 en un método de secuenciación de Sanger o de tipo Sanger.
60. Un método de uso de un nucleótido como se define en 1, en el cual dicho método incluye un método de secuenciación de Sanger o de tipo Sanger.
- 35 En los siguientes ejemplos se describen estructuras adecuadas de nucleótidos y se muestran en los dibujos acompañantes.
- Ester etílico de ácido 3-(2,2-dietoxi-etoxi)-benzoico



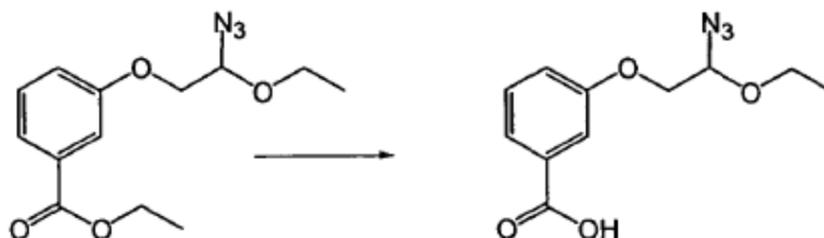
- Se calentaron a 120 °C 2-bromoacetaldehído dietil acetal (3 ml, 20 mmol), 3-hidroxi-benzoato de etilo (1.66g, 10mmol), carbonato de potasio (2.76 g, 20 mmol) y yoduro de sodio (0.298 g, 2 mmol) en dimetil formamida (DMF) (15 ml) por 17 horas. Se adicionó otro lote de 2-bromoacetaldehído dietil acetal (3 ml, 20 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C por otras 24hrs. La reacción se enfrió un a temperatura ambiente y todos los solventes se evaporaron a presión reducida. Los residuos se repartieron entre diclorometano (DCM) (200 ml) y agua (200 ml). La capa de DCM fue separada y la capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM (2 x 100 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (4 x 20 cm). El producto fue eluido con DCM al 100% y se obtuvo el compuesto del título como un aceite incoloro (2.21 g, 78.3%).
- 5
- 10 RMN ¹H [CDCl₃]: 7.58 (1H, Ar-H, d J 7.7), 7.51 (1H, Ar-H, dd, J 2.4 y 1.5), 7.27 (1H, Ar-H, t, J 8.0), 7.05 (1H, Ar-H, dd, J 7.9 y 2.3), 4.79 (1H, CH, t, J 5.2), 4.20 (2H, OCH₂, q, J 7.2), 3.99 (2H, ArOCH₂, d, J 5.2), 3.75-3.65 (2H, OCH₂, m), 3.63-3.53 (2H, OCH₂, m), 1.33 (3H, CH₃, t, J 7.2) y 1.19 (6H, CH₃, t, J 7.1).

Ester etílico de ácido 3-(2-azido-2-etoxi-etoxi)-benzoico



- 15 A una mezcla de éster etílico de ácido 3-(2,2-dietoxi-etoxi)-benzoico (1.128 g, 4 mmol) y azidotrimetilsilano (0.584 ml, 4.4 mmol) se adicionó SnCl₄ (40 μl) a temperatura ambiente. Después de 1 h, los precipitados se retiraron por filtración y el filtrado fue evaporado a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol, después de 10 minutos se retiró el solvente a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (3 x 20 cm). El producto fue eluido con éter de petróleo al 10% (60-80 °C) en DCM. El compuesto del título fue obtenido como un aceite incoloro (0.909 g, 81.5%).
- 20 RMN ¹H [CDCl₃]: 7.51 (1H, Ar-H, d J 7.7), 7.41 (1H, Ar-H, dd, J 2.6 y 1.5), 7.19 (1H, Ar-H, t, J 7.9), 6.96 (1H, Ar-H, ddd, J 8.2, 2.7 y 0.9), 4.63 (1H, CHN₃, t, J 5.1), 4.20 (2H, OCH₂, q, J 7.2), 4.05-3.90 (2H, ArOCH₂, m), 3.80-3.78 (1H, OCH₂, Ha, m), 3.55-3.47 (1H, OCH₂, Hb, m), 1.22(3H, CH₃, t, J 7.1) y 1.13(3H, CH₃, t, J 7.1).

Ácido 3-(2-azido-2-etoxi-etoxi)-benzoico

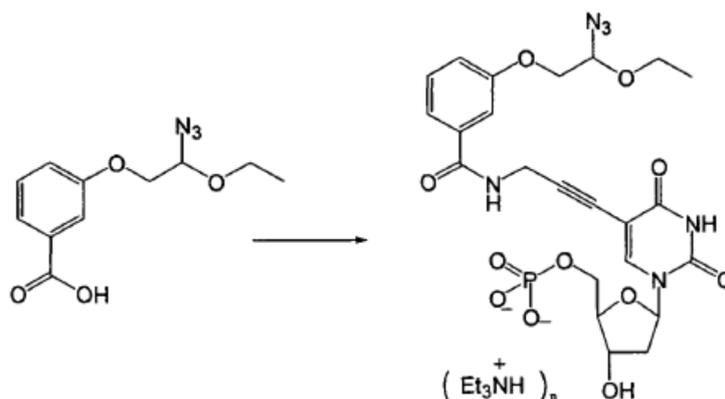


- 25 Se agitó éster etílico de ácido 3-(2,2-dietoxi-etoxi)-benzoico (0.279 g, 1 mmol) con hidróxido de sodio acuoso de 4 M (2.5 ml, 10 mmol) y etanol (2.5 ml) a temperatura ambiente. Después de 4 hrs, todos los solventes se retiraron a presión reducida y el residuo se disolvió en 50 ml de agua. La solución fue acidificada con HCl de 1 N a pH 2 y luego se extrajo

con DCM (3 x 50 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El compuesto del título fue obtenido como un sólido incoloro (0.247 g, 98.4%).

5 RMN ¹H [CDCl₃]: 7.68 (1H, Ar-H, d J 7.7), 7.58 (1H, Ar-H, dd, J 2.5 y 1.5), 7.34 (1H, Ar-H, t, J 8.0), 7.13 (1H, Ar-H, dd, J 7.4 y 2.7), 4.74 (1H, CHN₃, t, J 5.0), 4.20-4.02 (2H, ArOCH₂, m), 3.95-3.80 (1H, OCH₂, Ha, m), 3.70-3.55 (1H, OCH₂, Hb, m) y 1.24 (3H, CH₃, t, J 7.1).

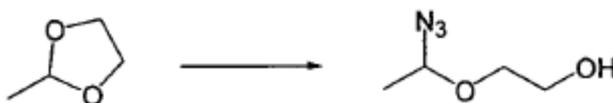
Sal trietilamonio de mono-[5-(5-{3-[3-(2-azido-2-etoxi-etoxi)-benzoilamino-prop-1-inil]-2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il}-3-hidroxi-tetrahydro-furan-2-il) éster del ácido fosfórico



10 Ácido 3-(2,2-dietoxi-etoxi)-benzoico (3.77 mg, 15 μmol) se agitó con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (3.84 mg, 15 μmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (1.83 mg, 15 μmol) en DMF (1 ml) seco a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, toda la mezcla de reacción se adicionó a una solución de la sal trietil amonio de mono-{5-[5-(3-amino-prop-1-inil)-2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il]-3-hidroxi-tetrahydro-furan-2-il} éster de ácido fosfórico (5 μmol) en regulador de pH de carbonato de 0.1 M (NaHCO₃ de 0.1 M / Na₂CO₃ de 0.1 M, v/v, 1:1) (0.5 ml). Después de 5 hrs a temperatura ambiente, la reacción fue diluida con regulador de pH de bicarbonato de trietiloamonio de 0.05 M (TEAB) (TEAB, pH 7.5) (10 ml). La solución resultante fue aplicada a una columna corta de DEAE A-25 (1 x 5 cm). La columna fue eluida inicialmente con regulador de pH TEAB de 0.1 M (50 ml) y luego regulador de pH de 0.7 M (50 ml). Los eluyentes de TEAB de 0.7 M fueron recogidos y evaporados a presión reducida. El residuo fue co-evaporado con MeOH (2 x 10 ml) y luego purificado mediante HPLC preparativa [gradiente de HPLC: A, TEAB de 0.1 a 100%; B MeCN de 100%; 0-2 min, 5% B (flujo 2-10 ml/min); 2-19 min, 5-40% B (flujo 10 ml/min); 19-21 min, 40-95% B (flujo 10 ml/min); 21-24 min, 95% B (flujo 10 ml/min); 24-26 min, 95-5% B (flujo 10 ml/min); 26-30 min, 5% B (flujo 10-2 ml/min)]. El producto con tiempo de retención de 19.6 min fue recogido y evaporado a presión reducida y el residuo fue co-evaporado con metanol (3 x 5 ml) para dar el compuesto del título como sales de trietil amonio (3.67 mg, rendimiento 80%). RMN ¹H en D₂O indicó aproximadamente 3,2 contraiones de trietilamonio.

25 RMN ¹H [D₂O]: 7.89 (1H, H-6, s), 7.44-7.31 (3H, Ar-H, m), 7.28 (1H, Ar-H, m), 7.12 (1H, Ar-H, dt, J 7.1 y 2.3), 6.17 (1H, H-1', t, J 6.9), 4.96 (1H, CHN₃, t, J 4.4), 4.43-4.35 (1H, H-3', m), 4.25 (2H, CHN, s), 4.18-4.06 (2H, H-5', m), 4.05-3.90 (1H, H-4', m), 3.89-3.50 (4H, ArOCH₂, OCH₂, m), 3.03 (19H, CH₂N, q, J 7.3), 2.25-2.15 (2H, CH₂, m), 1.13 (32H, CH₃, t, J 7.3). 31P [D₂O]: 5.17 (s). MS-ES(-), m/z 593 [M-].

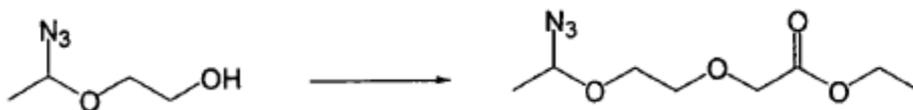
2-(1-Azido-etoxi)-etanol



30 A una mezcla de 2-metil dioxolano (0.897 ml, 10 mmol) y azidotrimetilsilano (1.6 ml, 12 mmol) se adicionó SnCl₄ (40 μl) a -78 °C. Después de la adición, se retiró el baño de enfriamiento y la reacción fue calentada a temperatura ambiente. Después de 1 h, la reacción fue tratada repartiéndose entre DCM (50 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (50 ml). La capa acuosa fue extraída adicionalmente con DCM (20 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol acuoso al 10%. Después de 2 h a temperatura ambiente, todos los solventes se retiraron a presión reducida. El compuesto del título fue obtenido como un aceite incoloro (224 mg, 17.1%).

35 RMN ¹H [CDCl₃]: 4.46 (1H, CHN₃, q, J 5.7), 3.77-3.68 (1H, OCH₂, Ha, m), 3.63(2H, OCH₂, t, J 4.3), 3.48-3.40 (1H, OCH₂, Hb, m) y 1.34 (3H, CH₃, d, J 5.7).

Éster etílico de ácido [2-(1-azido-etoxi)-etoxi]-acético



5 A una solución de 2-(1-azido-etoxi)-etanol (0.15 g, 1.14 mmol) en tetrahidrofurano seco (THF) (5 ml) se adicionó NaH (dispersión al 60%, 0.08 g, 2 mmol) a 0 °C. Después de 15 minutos, se adicionó 2-bromoacetato de etilo (0.222 ml, 2 mmol). La reacción fue mantenida a esta temperatura por 15 minutos y luego calentada a temperatura ambiente. La reacción fue neutralizada por adición de NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml) después de 1 h. Después de otro período de 5 minutos, la mezcla fue repartida entre DCM (50 ml) y NaHCO₃ saturado acuoso (50 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con DCM (50 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El compuesto del título fue obtenido como un aceite (0.162 g, 65.5%).

10 RMN ¹H [CDCl₃]: 4.51 (1H, CHN₃, q, J 5.6), 4.10 (2H, OCH₂, q, J 7.1), 4.03 (2H, OCH₂C(O), s), 3.85-3.77 (1H, OCH₂, H_a, m), 3.67-3.57 (3H, OCH₂, H_b, OCH₂, m), 1.37 (3H, CH₃, d, J 5.7) y 1.17 (3H, CH₃, t, J 7.1).

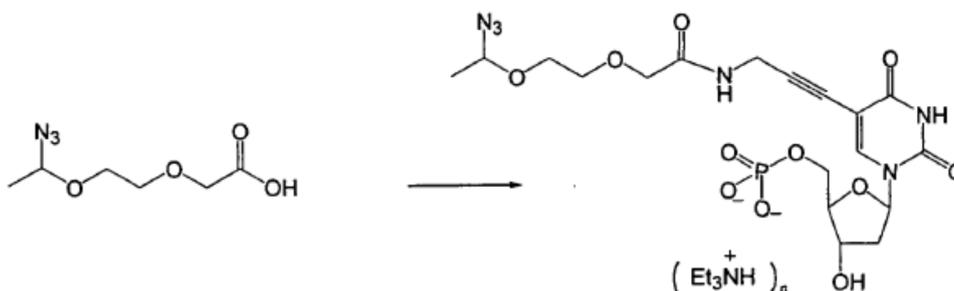
Ácido [2-(1-Azido-etoxi)-etoxi]-acético



15 Éster etílico de ácido [2-(1-azido-etoxi)-etoxi]-acético (0.10 g, 0.46 mmol) se agitó con hidróxido de sodio acuoso de 4 M (1.15 ml, 4.6 mmol) y etanol (1.15 ml) a temperatura ambiente. Después de 4 h, todos los solventes se retiraron a presión reducida y el residuo se disolvió en 5 ml de agua. La solución fue ajustada a pH 5 con KH₂PO₄ de 1 N y luego extraída con DCM (2 x 15 ml). La capa acuosa fue acidificada luego con HCl de 1 N a pH 2 y luego extraída con DCM (3 x 25 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El compuesto del título fue obtenido como un sólido incoloro (42 mg, 48.3%).

20 RMN ¹H [CDCl₃]: 4.55 (1H, CHN₃, q, J 5.7), 4.15 (2H, OCH₂C(O), s), 3.92-3.84 (1H, OCH₂, H_a, m), 3.74-3.70 (2H, OCH₂, m), 3.68-3.57 (1H, OCH₂, H_b, m) y 1.44 (3H, CH₃, d, J 5.7).

Sal trietilamonio de mono-[5-[5-(3-{2-[2-(1-azido-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-prop-1-inil)-2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il]-3-hidroxi-tetrahydro-furan-2-il] éster de ácido fosfórico



25 Ácido [2-(1-azido-etoxi)-etoxi]-acético (5.7 mg, 30 μmol) se agitó con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (7.68 mg, 30 μmol) y DMAP (3.7 mg, 30 μmol) en DMF (2 ml) seco a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, toda la mezcla de reacción se adicionó a una solución de la sal trietilamonio de mono-[5-[5-(3-amino-prop-1-inil)-2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il]-3-hidroxi-tetrahydro-furan-2-il] éster de ácido fosfórico (10 μmol) en TEAB de 0.1 M (0.5 ml). Después de 5 h a temperatura ambiente, la reacción fue diluida con regulador de pH de bicarbonato de trietilamonio de 0.05 M (TEAB, pH 7.5) (10 ml). La solución resultante fue aplicada a una columna corta de DEAE A-25 (1 x 10 cm). La columna fue eluida inicialmente con regulador de pH TEAB de 0.1 M (50 ml) y luego regulador de pH de 0.5 M (50 ml). Los diluyentes de TEAB de 0.5 M fueron recogidos y evaporados a presión reducida. El residuo fue co-evaporado con MeOH (2 x 10 ml) y luego purificado mediante HPLC preparativa [gradiente de HPLC: A, TEAB de 0.1 M al 100%; B MeCN al 100%; 0-2 min, 5% B (flujo 2-10 ml/min); 2-15 min, 5-15% B (flujo 10 ml/min); 15-28 min, 15-22% B (flujo 10 ml/min); 28-30 min, 22-95% B (flujo 10 ml/min); 30-34 min, 95% B (flujo 10 ml/min); 34-36 min, 95-5% B (flujo 10 ml/min); 36-40 min, 5% B (flujo 10-2 ml/min)]. El producto con tiempo de retención de 21.3 min fue recogido y evaporado a presión reducida y el residuo fue

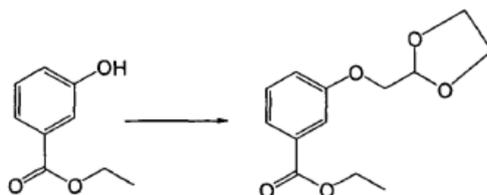
30

35

co-evaporado con metanol (3 x 5 ml) para dar el compuesto del título como sal trietil amonio (9.3 mmol, cuantificación a λ_{288} en regulador de pH TEAB de 0.1 M, 93%). RMN ^1H en D_2O indicó aproximadamente cinco contraiones de trietilamonio.

5 RMN ^1H [D_2O]: 7.85 (1H, H-6, s), 6.15 (1H, H-1', t, J 6.8), 4.75 (1H, CHN_3 , q, J 5.7), 4.38 (1H, H-3', m), 4.09 (2H, $\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})$, s), 3.99 (2H, CHN , s), 3.95 (1H, H-4', m), 3.86-3.60 (6H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, H-5', m), 3.03 (30H, CH_2N , q, J 7.2), 2.22-2.12 (2H, CH_2 , m), 1.31 (3H, CH_3 , d, J 5.7) y 1.11 (45H, CH_3 , t, J 7.2). ^{31}P [D_2O]: 5.14 (s). MS-ES(-), m/z, 531 [M-1].

Ester etílico de ácido 3-([1,3]-dioxolan-2-ilmetoxi)-benzoico

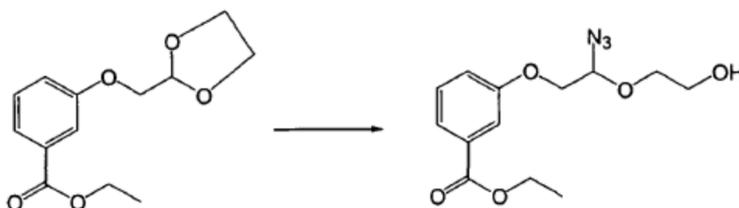


10 2-Bromometil-1, 3-dioxolano (8.3 ml, 80 mmol), 3-hidroxi-benzoato de etilo (3.32g, 20mmol), carbonato de potasio (5.53 g, 40 mmol) y yoduro de sodio (1.2 g, 8 mmol) fueron calentados a 120 °C en DMF (8 ml) por 17 h. La reacción fue enfriada a temperatura ambiente y todos los solventes fueron evaporados a presión reducida. Los residuos fueron repartidos entre DCM (250 ml) y agua (250 ml). La capa de DCM fue separada y la capa acuosa fue extraída nuevamente con DCM (2 x 100 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO_4 y evaporados a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (4 x 25 cm). El producto fue eluido con éter de petróleo (60-80 °C) al 20% en DCM y el compuesto del título fue obtenido como un aceite ligeramente marrón (4.63g, 91.8%). APCI-MS, m/z 252.95 (M+1).

15

RMN ^1H [CDCl_3]: 1.39 (3H, CH_3 , t, J 7.2), 3.96-4.09 (6H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, ArOCH_2 , m), 4.36 (2H, OCH_2 , q, J 7.2), 5.31 (1H, CH, t, J 4.0), 7.14 (1H, Ar-H, ddd, J 1.6, 2.6 y 8.2), 7.34 (1H, Ar-H, t, J 7.9), 7.59 (1H, Ar-H, dd, J 1.5 y 2.5) y 7.67 (1H, Ar-H, dt, J 1.4 y 7.6).

Éster etílico de ácido 3-[2-Azido-2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-benzoico

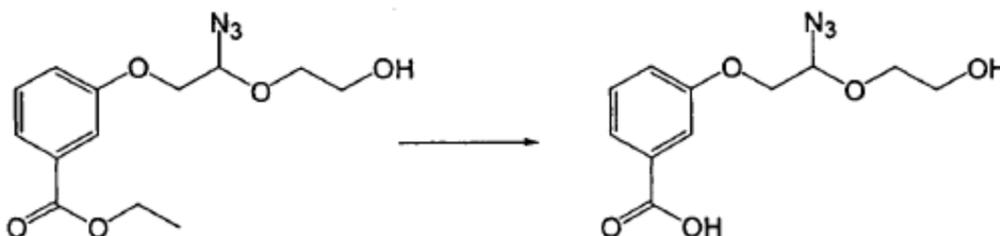


20

25 A una mezcla de éster etílico de ácido 3-([1,3]-dioxolan-2-ilmetoxi)-benzoico (2.02 g, 8 mmol) y azidotrimetilsilano (1.17 ml, 8.8 mmol) se adicionó SnCl_4 (60 μl) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 2 h, se adicionó metanol acuoso al 2% (10 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la reacción a temperatura ambiente por 30 minutos. Todos los solventes fueron evaporados a presión reducida. El residuo fue co-evaporado con etanol (2 x 10 ml). El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (3 x 20 cm). El producto fue eluido con metanol al 0 a 1% en DCM. El compuesto del título fue obtenido como un aceite incoloro (2.01 g, 85.1%). APCI-MS, m/z 267.90 (M- N_2 +1).

RMN ^1H [CDCl_3]: 1.38 (3H, CH_3 , t, J 7.1), 3.73-3.86 (3H, OCH_2 , H_a , OCH_2 , m), 3.99-4.05 (1H, OCH_2 , H_b , m), 4.17 (1H, ArOCH_2 , H_a , dd, J 4.9 y 10.1), 4.23 (1H, ArOCH_2 , H_b , dd, J 5.2 y 10.1), 4.38 (2H, OCH_2 , q, J 7.1), 4.89 (1H, CHN_3 , t, J 5.1), 7.13 (1H, Ar-H, dd, J 2.1 y 8.4), 7.36 (1H, Ar-H, t, J 7.9), 7.60 (1H, Ar-H, dd, J 1.0 y 2.5) y 7.70 (1H, Ar-H, d, J 7.8).

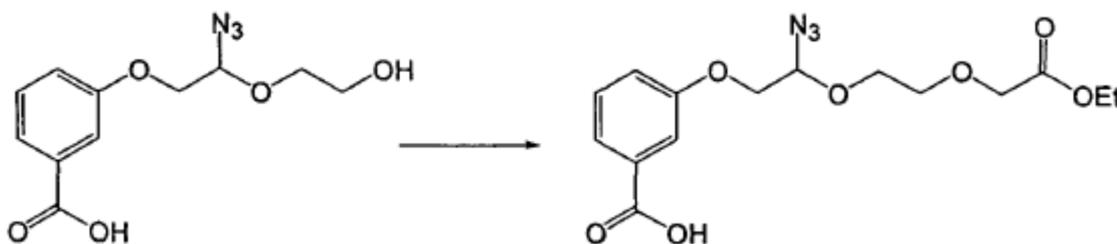
30 Ácido 3-[2-azido-2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-benzoico



Se agitó éster etílico de ácido 3-[2-azido-2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-benzoico (1.34 g, 4.55 mmol) con hidróxido de sodio acuoso de 4 M (11.4 ml, 45.5 mmol) y etanol (11.4 ml) a temperatura ambiente. Después de 3 h, se retiraron todos los solventes a presión reducida y el residuo se disolvió en 50 ml de agua. La solución fue acidificada con HCl de 1 N a pH 2 y luego fue extraída con DCM (3 x 50 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El compuesto del título fue obtenido como un sólido incoloro (1.2 g, 98.7%). ES-MS, m/z 265.85 (M-1).

RMN ¹H [CDCl₃]: 3.75-3.90 (3H, OCH₂, H_a, OCH₂, m), 4.00-4.08 (1H, OCH₂, H_b, m), 4.17 (1H, Ar-OCH₂, H_a, dd, J 4.8 y 10.1), 4.24 (1H, ArOCH₂, H_b, dd, J 5.1 y 10.1), 4.90 (1H, CH-N₃, t, J 5.1), 7.19 (1H, Ar-H, dd, J 2.5 y 8.2), 7.40 (1H, Ar-H, t, J 8.0), 7.60 (1H, Ar-H, s) y 7.70 (1H, Ar-H, d, J 7.9).

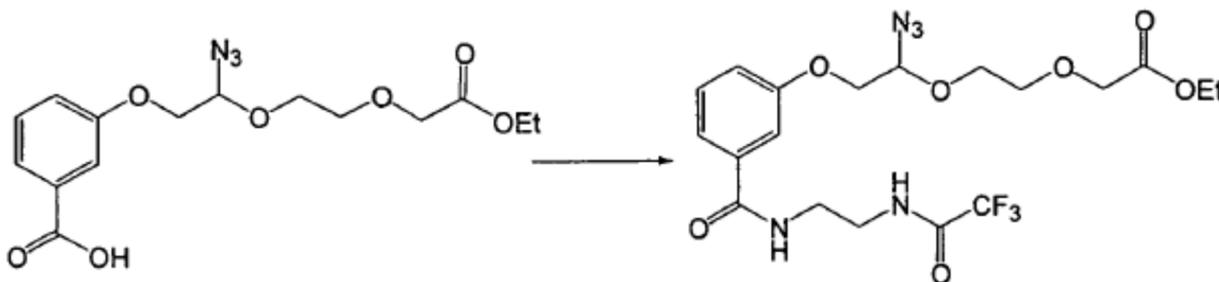
10 Ácido 3-[2-Azido-2-(2-etoxicarbonilmetoxi-etoxi)-etoxi]-benzoico



A una solución de ácido 3-[2-azido-2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-benzoico (0.535 g, 2 mmol) en THF seco (6 ml) se adicionó NaH (60% dispersión, 0.246 g, 6 mmol) a 0 °C. Después de 10 minutos, se adicionó 2-bromoacetato de etilo (0.488 ml, 4.4 mmol). La reacción fue calentada luego a temperatura ambiente y se agitó un 4 horas. La reacción fue neutralizada vertiéndola en agua fría con hielo (50 ml). La mezcla fue extraída con DCM (2 x 50 ml) y los extractos de DCM fueron descartados. La capa acuosa fue acidificada luego a pH 2 con HCl de 1 N y extraída con DCM (2 x 50 ml). Estos extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (1 x 20 cm). El compuesto del título, eluido con metanol al 2% en DCM, fue obtenido como un aceite (0.223 g, 31.6%). ES-MS, m/z 351.95 (M-1).

20 RMN ¹H [CDCl₃]: 1.29 (3H, CH₃, t, J 7.2), 3.81 (2H, OCH₂, t, J 4.4), 3.90 (1H, OCH₂, H_a, m), 4.04 (1H, OCH₂, H_b, m), 4.13-4.27 (6H, ArOCH₂, OCH₂ y OCH₂C(O)), 4.95 (1H, CH-N₃, m), 7.19 (1H, Ar-H, dd, J 1.7 y 8.3), 7.40 (1H, Ar-H, t, J 7.8), 7.63 (1H, Ar-H, s) y 7.76 (1H, Ar-H, d, J 7.6).

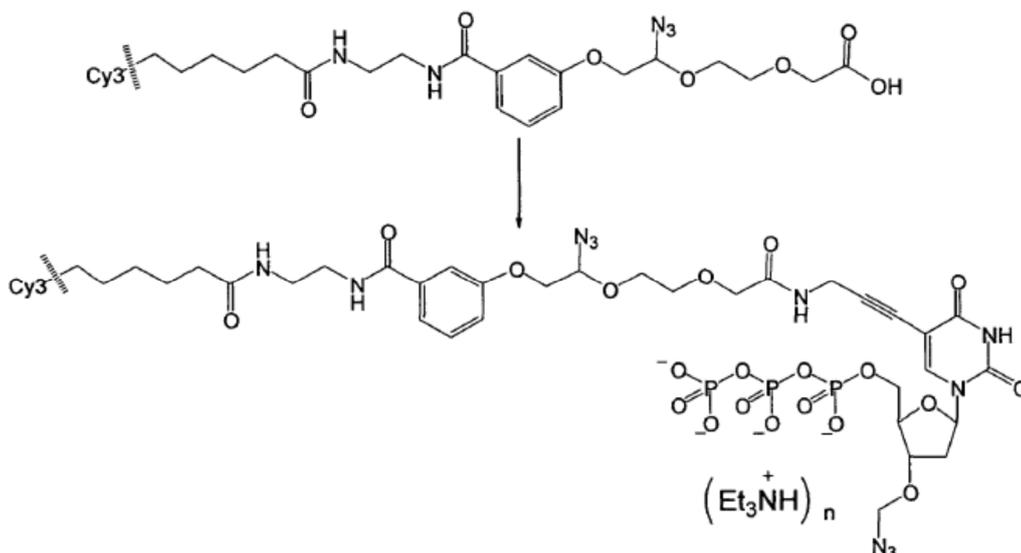
Éster etílico de ácido [2-(1-azido-2-{3-[2-(2,2,2-trifluoroacetilamino)-etilcarbamoil]-fenoxi}-etoxi)-etoxi]-acético



25 Se agitó ácido 3-[2-azido-2-(2-etoxicarbonilmetoxi-etoxi)-etoxi]-benzoico (0.212 g, 0.6 mmol) con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (0.184 g, 0.72 mmol) y DMAP (0.088g, 0.72 mmol) en DMF seco (1 ml) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se adicionó sal de ácido trifluoroacético de N-(2-amino-etil)-2,2,2-trifluoro-acetamida (0.194 g, 0.72 mmol) seguido de diisopropiletilamina (DIPEA) (0.251 ml, 1.44 mmol). La mezcla de reacción se agitó luego a temperatura ambiente por 17 horas. Todos los solventes fueron evaporados a presión reducida y los residuos se repartieron entre DCM (50 ml) y NaH₂PO₄ acuoso (1 N, 50 ml). La capa acuosa fue extraída adicionalmente con DCM (2 x 25 ml). Todos los extractos de DCM fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y evaporados a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna (1 x 20 cm). El compuesto del título, eluido con metanol al 1 % en DCM, fue obtenido como un aceite (0.255 g, 86.6%). ES-MS, m/z 490.10 (M-1).

35 RMN ¹H [CDCl₃]: 1.28 (3H, CH₃, t, J 7.1), 3.60 (2H, CH₂N, m), 3.69 (2H, CH₂N, m), 3.80 (2H, OCH₂, t, J 4.3), 3.86 (1H, OCH₂, H_a, m), 4.04 (1H, OCH₂, H_b, m), 4.10-4.25 (6H, ArOCH₂, OCH₂ y OCH₂C(O), m), 4.92 (1H, CH-N₃, m), 6.85 (1H, NH, br), 7.09 (1H, Ar-H, m), 7.37 (3H, Ar-H, m), y 7.96 (1H, NH, br).

Ácido (2-[2-[3-(2-amino-etilcarbamoil)-fenoxi]-1-azido-etoxi]-etoxi)-acético



Se agitó ácido [2-(1-azido-2-{3-[2-(6-Cy3-hexanoilamino)-etilcarbamoil]-fenoxi}-etoxi)-etoxi]-acético (2 μmol) con carbonatos de N,N'-disuccinimidilo (0.563 mg, 2.2 μmol) y DMAP (0.269 mg, 2.2 μmol) en DMF seco (1 ml) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, toda la mezcla de reacción se adicionó a una solución de la sal de tri-n-butil amonio de [5-(3-amino-prop-1-inil)-3'-azidometoxi-dUTP (6 mmol, preparada evaporando una solución acuosa de [5-(3-amino-prop-1-inil)-3'-azidometoxi-dUTP con tri-n-butil amina (72 μl , 300 μmol)). La mezcla de reacción fue sometida a sonicación 5 minutos, luego se agitó a temperatura ambiente por 3 h. La mezcla de reacción fue diluida con TEAB de 0.1 M TEAB (10 ml) enfriado, la solución resultante fue aplicada a una columna corta de DEAE A-25 (1 x 10 cm). La columna fue eluida inicialmente con regulador de pH TEAB de 0.1 M (50 ml) y luego regulador de pH de 1.0 M (50 ml). Los eluatos de TEAB de 1.0 M fueron recogidos y evaporados a presión reducida. El residuo fue co-evaporado con MeOH (2 x 10 ml) y luego purificado mediante HPLC semi-preparativa [gradiente de HPLC: A, 100% TEAB de 0.1 M; B 100% MeCN; 0-2 min, 5% B (flujo 2-5 ml/min); 2-14 min, 5-20% B (flujo 5 ml/min); 14-20 min, 20-23% B (flujo 5 ml/min); 20-22 min, 23-95% B (flujo 5 ml/min); 22-25 min, 95% B (flujo 5 ml/min); 25-26 min, 95-5% B (flujo 5 ml/min); 26-30 min, 5% B (flujo 5-2 ml/min)]. El producto con tiempo de retención de 19.2 min fue recogido y evaporado a presión reducida y el residuo fue co-evaporado con metanol (3 x 5 ml) para dar el compuesto del título como sal de trietil amonio (1.22 mmol, cuantificación a λ_{550} en regulador de pH TEAB de 0.1 M, 61.1%). RMN ^1H en D_2O indicó aproximadamente siete contraiones de trietilamonio.

RMN ^1H [D_2O]: 1.14 (63H, CH_3 (Et_3N), t, J 7.3), 1.23 (3H, CH_3 , t, J 7.1), 1.49 (2H, CH_2 , m), 1.55 (2H, CH_2 , m), 1.60 (6H, 2 x CH_3 , s), 1.62 (6H, 2 x CH_3 , s), 1.95-2.07 (1H, $\text{H}_{a-2'}$, m), 2.13 (2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$, t, J 6.7), 2.17-2.27 (1H, $\text{H}_{b-2'}$, m), 3.05 (42 H, CH_2 (Et_3N), q, J 7.3), 3.27 (2H, CH_2N , t, J 5.7), 3.37 (2H, CH_2N , t, J 5.8), 3.55-3.79 (5H, m), 3.80-4.10 (11H, m), 4.15 (1H, $\text{H}-4'$, m), 4.38 (1H, $\text{H}-3'$, m), 4.80 (2H, $\text{OCH}_2\text{-N}_3$, s), 4.88 (1H, CH-N_3 , m), 5.95 (1H, $\text{H}-1'$, q, J 7.6), 6.13 (1H, =CH, d, J 13.4), 6.20 (1H, =CH, d, J 13.4), 6.84 (1H, Ar-H, d, J 7.3), 7.05-7.24 (5H, Ar-H, m), 7.60-7.80 (5H, Ar-H y H-6, m) y 8.35 (1H, =CH, t, J 13.4). RMN ^{31}P [D_2O]: -20.82 (βP , m), -10.07 (αP , d, J 16.2) y -4.90 (γP , d, J 18.9).

2 ciclos de nucleósido trifosfato completamente funcional (FFN)

25 Preparación de perlas

Tomar 15 μL de perlas recubiertas con estreptavidina Dynabeads® M-280 (DynaL Biotech), eliminar el regulador de pH de almacenamiento y lavar 3 veces con 150 μL de regulador de pH TE (Tris.HCl pH 8, 10 mM y EDTA, 1 mM). Resuspender en 37.5 μL de regulador de pH B & W (Tris-HCl de 10 mM pH 7.5, EDTA de 1 mM y NaCl de 2.0 M), añadir 10 μL de ADN en horquilla etiquetado con ^{32}P biotinilado y añadir 27.5 μL de agua. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Eliminar el regulador de pH y lavar las perlas 3 veces con 100 μL de regulador de pH TE.

Incorporación del 1^{er} FFN

75 μl de reacción, Tris.HCl pH 8.8 50 mM, Tween-20, al 0.01%, MgSO_4 4 mM, MnCl_2 , 0.2 mM, añadir FFN de 2 μM y polimerasa de 100 nM (Thermococcus sp. 9°N exo -Y409V A485L suministrado por New England Biolabs). Después, esta solución se añade a las perlas, se mezcla minuciosamente y se incuba a 65°C tomando muestras de 5 μl a los 3 y 10 minutos y deteniendo con 5 μl de regulador de pH de carga de gel (xileno cianol - solución de colorante azul de bromofenol, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción se retira de las perlas restantes y las perlas se lavan 3 veces con 100 μl de regulador de pH TE.

Etapa de extracción

ES 2 604 951 T3

Se retiró una muestra de la reacción de incorporación y se añadió 1 μM de dNTPs (0.25 μM cada uno). Esto se detuvo después de 10 minutos añadiendo 5 μl de regulador de pH de carga de gel.

Etapa de desbloqueo

- 5 Se añaden 50 μl de Tris-(2-carboxietil)fosfina, sal trisódica (TCEP) 0.1M a las perlas y se mezclan minuciosamente. La mezcla fue incubada luego a 65 °C por 15 minutos. La solución de desbloqueo se retira y las perlas se lavan 3 veces con 100 μl de regulador de pH TE. Las perlas fueron resuspendidas luego in 50 μl de TE y se retiró una muestra de 5 μl y 5 μl de regulador de pH de carga de gel.

Incorporación del 2° FFN

- 10 20 μl de reacción, Tris.HCl pH 8.8 50 mM, Tween-20, al 0.01%, MgSO_4 , 4 mM, MnCl_2 , 0.4 mM, adicionar FFN de 2 μM y polimerasa de 100 nM (*Thermococcus* sp. 9°N exo -Y409V A485L suministrado por New England Biolabs). Esta solución se adiciona luego a las perlas y se mezcla minuciosamente y se incuba a 65 °C tomando muestras de 5 μl a 3 y 10 minutos y deteniendo con 5 μl de regulador de pH de carga de gel.

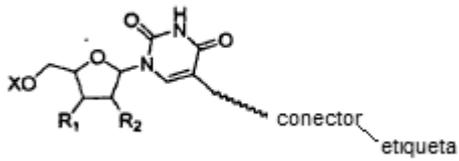
Etapa de extracción

- 15 Se retiró una muestra de la reacción de incorporación se adicionó a 1 μM de dNTPs (0.25 μM cada uno). Esto se detuvo después de 10 minutos añadiendo 5 μl de regulador de pH de carga de gel.

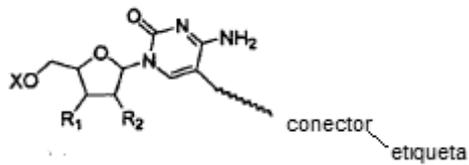
Antes de cargar las muestras a un gel de secuenciación de acrilamida al 12% de desnaturalización, se adicionaron 0.5 μl de EDTA (0.5 M) a cada muestra y se calentaron luego a 95 °C por 10 minutos.

REIVINDICACIONES

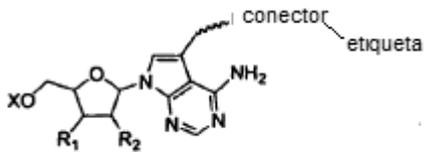
1. Un nucleósido o nucleótido que tiene una base unida a una etiqueta detectable por medio de un conector disociable, caracterizado porque el conector disociable comprende un grupo alilo o azido y el conector es disociable por contacto con fosfinas hidrosolubles o catalizadores hidrosolubles de metal de transición, a base de fosfina.
- 5 2. Un nucleósido o nucleótido de la reivindicación 1 en el cual el nucleósido o nucleótido comprende además un residuo de didesoxirribosa.
3. Un nucleósido o nucleótido de la reivindicación 1 en el cual el nucleósido o nucleótido comprende además un residuo de ribosa o desoxirribosa con un grupo protector de hidroxilo unido al átomo de oxígeno 2' o 3'.
- 10 4. Un nucleósido o nucleótido de la reivindicación 3 en el cual el conector y el grupo de protector son disociables en las mismas condiciones.
5. Un nucleósido o nucleótido de la reivindicación 3 en el cual el grupo protector es alilo o azidometilo.
6. Un nucleósido o nucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el cual la base es una purina, pirimidina o deazapurina.
7. Un nucleósido o nucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el cual la etiqueta detectable es un fluoróforo.
- 15 8. Una composición que comprende cuatro nucleósidos o nucleótidos de la reivindicación 1 en la cual cada nucleósido o nucleótido comprende una base unida a una etiqueta detectable por medio de un conector disociable, caracterizada porque el conector disociable comprende un grupo alilo o azido y el conector es disociable por contacto con fosfinas hidrosolubles o catalizadores hidrosolubles de metal de transición a base de fosfina y cada nucleósido o nucleótido lleva una etiqueta detectable diferente.
- 20 9. Un oligonucleótido que comprende un nucleósido o nucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Un oligonucleótido de la reivindicación 9 en el cual el oligonucleótido está unido a un soporte sólido.
11. Una micromatriz que comprende un oligonucleótido de la reivindicación 9.
- 25 12. Una composición que comprende un reactivo de disociación de fosfina y un oligonucleótido de la reivindicación 9 que tiene una base unida a una etiqueta detectable mediante un conector disociable, en la cual el conector disociable comprende un grupo alilo o azido.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la cual el reactivo de disociación de fosfina es una tri-alquil fosfina derivatizada que comprende uno o más residuos de sulfonato, amina, hidroxilo o carboxilato.
14. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 en la cual el conector disociable comprende un residuo alilo y la composición comprende además un reactivo de disociación de paladio.
- 30 15. Uso de un nucleósido o nucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en secuenciación.



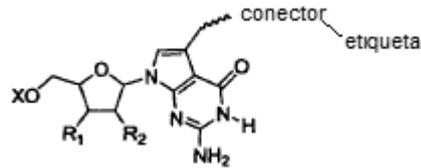
Uridina C5-conector



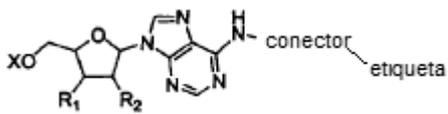
Citidina C5-conector



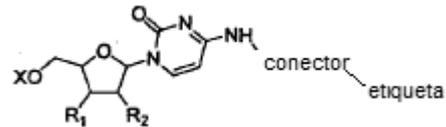
N7 desazaadenosina C7-conector



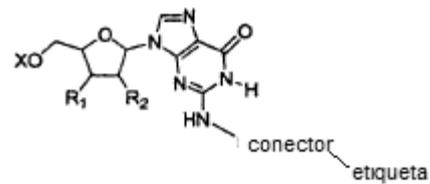
N7 desazaguanosina C7-conector



Adenosina N6-conector



Citidina N4-conector



Guanosina N2-conector

Donde R_1 y R_2 , que pueden ser iguales o Diferentes, se seleccionan cada uno de H, OH o cualquier grupo que puede transformarse En OH. Grupos adecuados para R_1 y R_2 se describen en la Figura 3
 $X = H$, fosfato, difosfato o trifosfato

Fig. 1

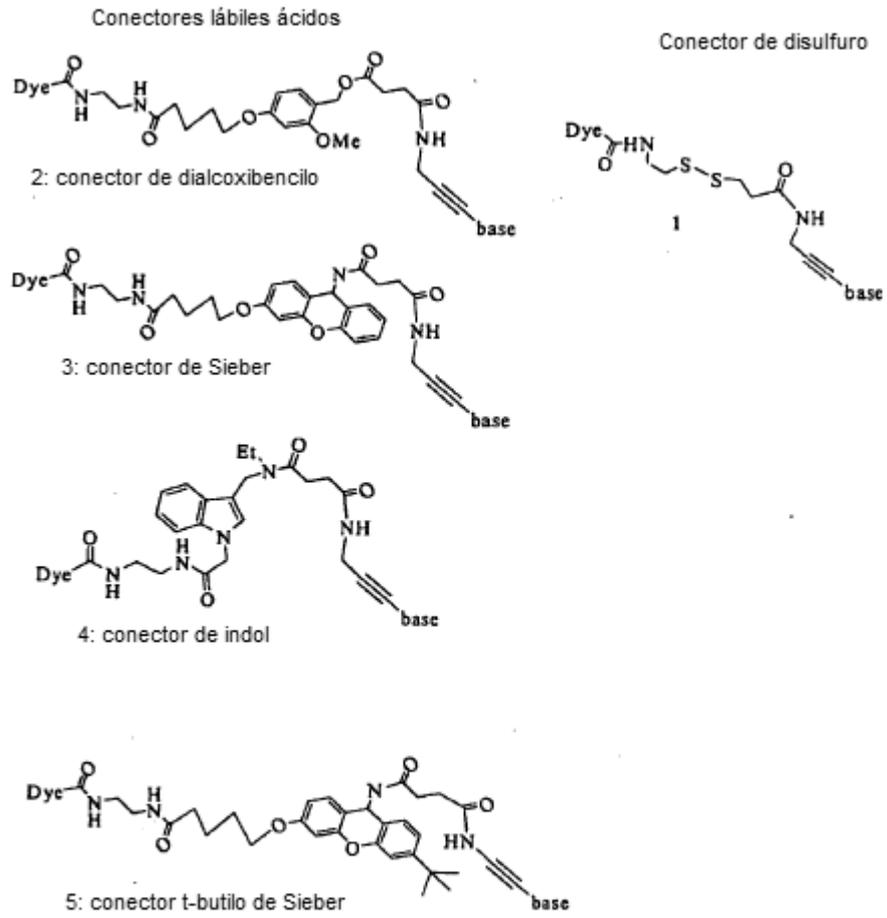
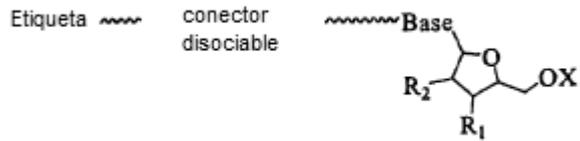
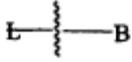


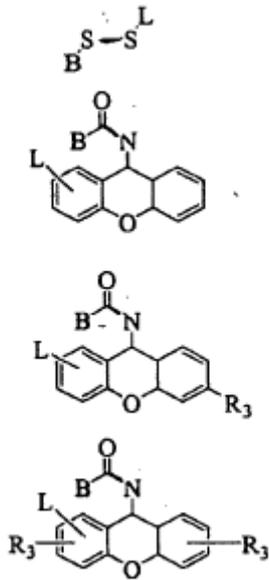
Fig. 2



donde R_1 y R_2 , que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan cada uno de H, OH, o cualquier grupo que pueda transformarse en un OH, incluyendo un carbonilo



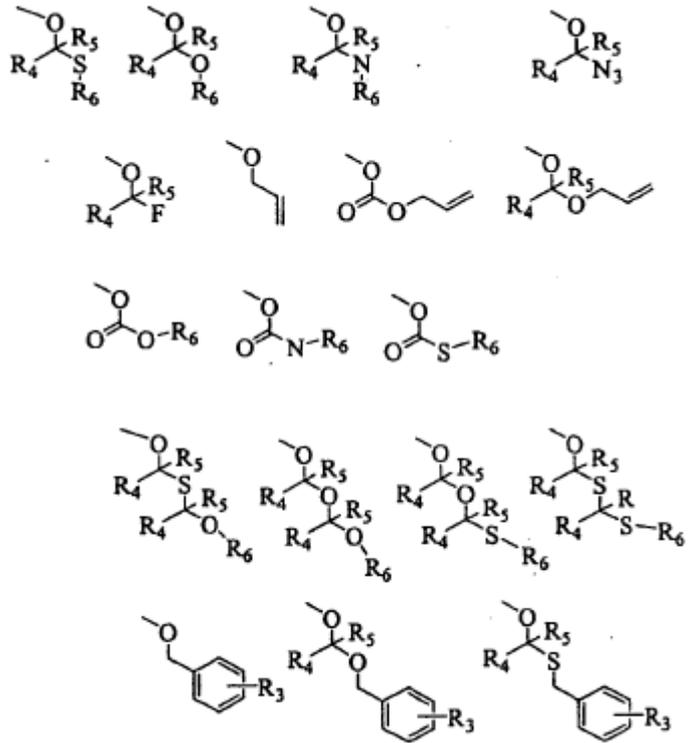
Conectores disociables pueden incluir:



R_3 representa uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo, alcoxi, amino o halógeno

De modo alternativo, los conectores disociables pueden construirse a partir de cualquier funcionalidad lábil usada en el bloqueo 3'

Los grupos R_1 y R_2 pueden incluir:



donde R_4 es H o alquilo, R_5 es H o alquilo y R_6 es alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo o bencilo

y X es fosfato, difosfato o trifosfato

Fig. 3

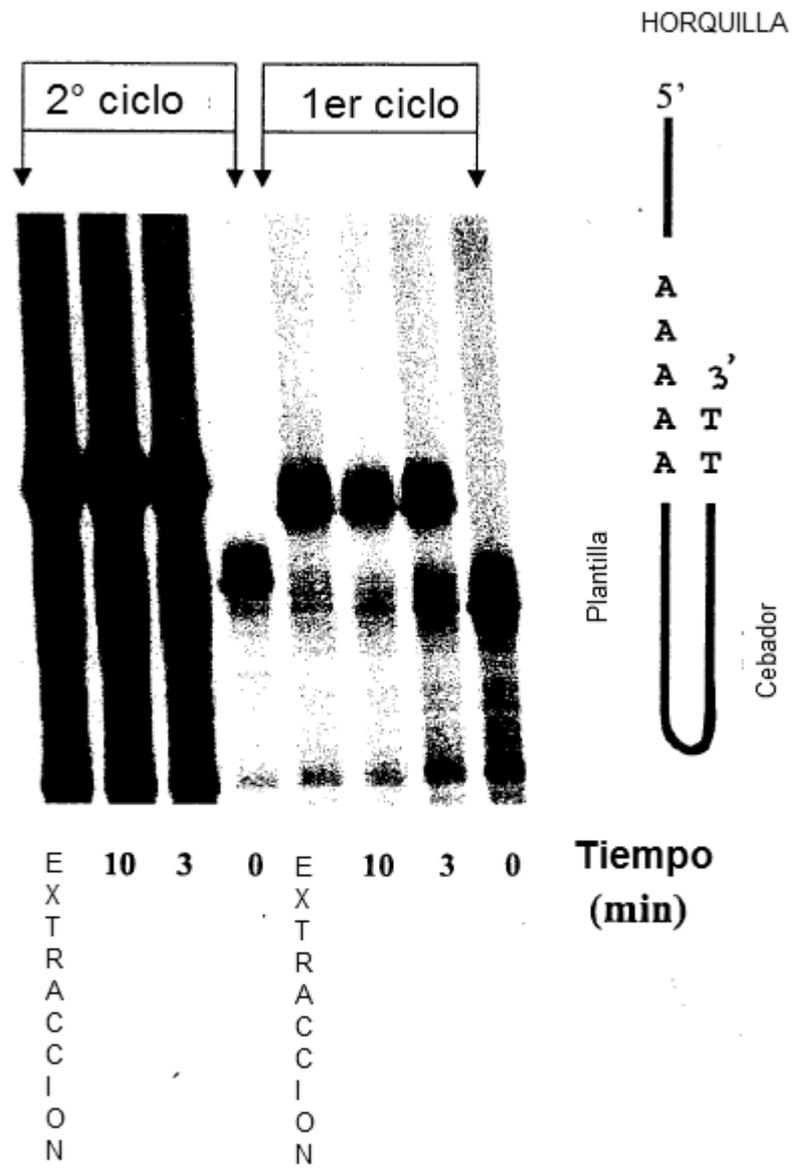


Fig. 4