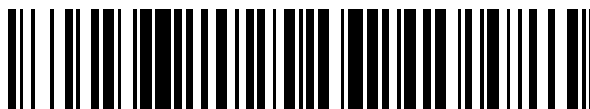


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 423**

51 Int. Cl.:

C07D 209/08 (2006.01)

C09B 23/02 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013** **PCT/EP2013/054783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO2014135221**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013** **E 13708427 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2964612**

54 Título: **Compuestos de polimetina y su uso como marcadores fluorescentes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROMANOV, NIKOLAI NIKOLAEVICH y
LIU, XIAOHAI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 620 423 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

Compuestos de polimetina y su uso como marcadores fluorescentes

La presente divulgación se relaciona con nuevos compuestos de polimetina y su uso como marcadores fluorescentes. En particular los compuestos se pueden utilizar como marcadores fluorescentes para nucleótidos en aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

Antecedentes

Se mencionan diversas publicaciones y documentos de patente en esta solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la técnica a la cual pertenece esta divulgación. La divulgación de cada una de estas publicaciones y documentos se incorpora mediante referencia aquí.

La detección no radiactiva de ácidos nucleicos que utilizan marcadores fluorescentes es una tecnología importante en biología molecular. Muchos de los procedimientos empleados en la tecnología de ADN recombinante antes se basaban en gran medida en el uso de nucleótidos o polinucleótidos marcados radiactivamente, por ejemplo con ^{32}P . Los compuestos radiactivos permiten la detección sensible de ácidos nucleicos y otras moléculas de interés. Sin embargo, existen serias limitaciones en el uso de isótopos radiactivos tales como su coste, vida útil limitada y lo más importante consideraciones de seguridad. Al eliminar la necesidad de marcadores radiactivos se mejora la seguridad mientras que se reduce el impacto ambiental y los costes asociados con, por ejemplo, la eliminación de reactivos. Los métodos susceptibles de detección fluorescente no radiactiva incluyen a modo de ejemplo no limitante, secuenciación automática de ADN, métodos de hibridación, detección en tiempo real de productos de reacción en cadena de polimerasa e inmunoensayos.

Para muchas aplicaciones, es deseable emplear múltiples marcadores fluorescentes espectralmente distinguibles con el fin de lograr detección independiente de una pluralidad de analitos espacialmente superpuestos. En dichos métodos múltiples el número de recipientes de reacción se puede reducir simplificando los protocolos experimentales y facilitando la producción de kits de reactivos específicos a aplicación. En la secuenciación del ADN automatizada de múltiples colores por ejemplo, la detección fluorescente múltiple permite el análisis de múltiples bases de nucleótidos en un solo carril de electroforesis aumentando de esta manera el rendimiento sobre los métodos de un solo color y reduciendo las incertidumbres asociadas con variaciones de movilidad electroforética entre carriles.

Sin embargo, la detección fluorescente múltiple puede ser problemática y se presenta una serie de factores importantes que restringen la selección de marcadores fluorescentes. En primer lugar, puede ser difícil encontrar compuestos colorantes cuyos espectros de emisión estén resueltos espectralmente de forma conveniente en una aplicación dada. Adicionalmente, cuando se utilizan diversos colorantes fluorescentes, para generar señales de fluorescencia en regiones espectrales distinguibles mediante excitación simultánea puede ser difícil ya que las bandas de absorción de colorantes, que se podrían utilizar para esto usualmente están ampliamente separadas, por lo que es difícil de lograr más o menor eficiencia de excitación de fluorescencia igual incluso para dos colorantes. Muchos métodos de excitación utilizan fuentes de luz de alta energía como láser y, por lo tanto, el colorante debe tener suficiente fotoestabilidad para resistir dicha excitación. Una consideración final de particular importancia en los métodos de biología molecular es el grado en el que los colorantes fluorescentes deben ser compatibles con la química de los reactivos utilizados, como por ejemplo solventes y reactivos de síntesis de ADN, reguladores, enzimas de polimerasa y enzimas de ligasa.

A medida que la tecnología de secuenciación avanza se ha desarrollado una necesidad de más compuestos colorantes fluorescentes, sus conjugados de ácidos nucleicos y grupos de colorantes que cumplen todas las restricciones anteriores y que sean susceptibles particularmente a métodos moleculares de alto rendimiento, tales como secuenciación en fase sólida y similares.

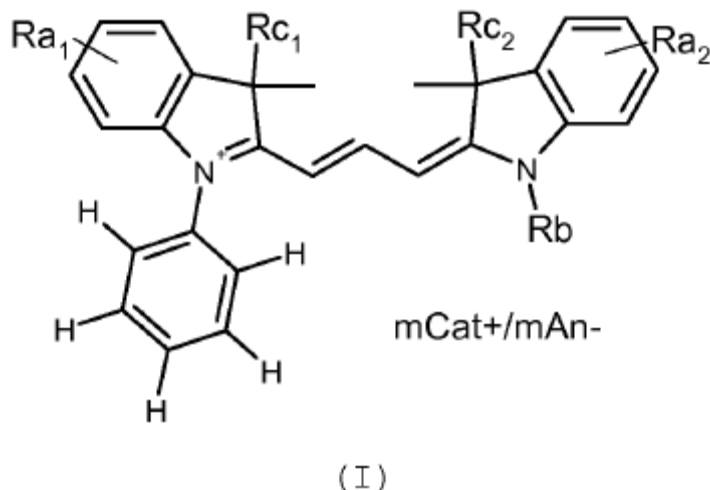
Las moléculas de colorantes fluorescentes con propiedades de fluorescencia mejoradas tales como intensidad de fluorescencia, forma y longitud de onda máxima de banda de fluorescencia pueden mejorar la velocidad y precisión de la secuenciación del ácido nucleico. La señal de fluorescencia fuerte es especialmente importante cuando se realizan mediciones en reguladores biológicos una base de agua y a mayor temperatura ya que la intensidad de fluorescencia de la mayoría de los colorantes es significativamente más baja en dichas condiciones. Más aún, la naturaleza de la base a la que se adhiere el colorante también afecta la fluorescencia máxima, intensidad de fluorescencia y otras propiedades de colorante espectral. Las interacciones específicas de secuencia entre las nucleobases y los colorantes fluorescentes se pueden adaptar mediante diseño específico de colorantes fluorescentes. La optimización de la estructura de los colorantes fluorescentes puede mejorar la eficiencia de incorporación de nucleótidos, reducir el nivel de errores de secuenciación y reducir el uso de reactivos en, y por lo tanto los costes de secuencia de ácidos nucleicos.

Se describen aquí construcciones de polimetina mejoradas y su uso como marcadores de biomoléculas, particularmente como marcadores para los nucleótidos utilizados en la secuenciación de ácidos nucleicos. Se pueden ver mejoras

particulares en la eficiencia de incorporación de nucleótidos marcados y la longitud de la secuenciación leída obtenible utilizando nuevas construcciones fluorescentes.

Resumen

De acuerdo con un primer aspecto esta divulgación proporciona compuestos colorantes de polimetina de la fórmula (I) o formas mesoméricas de los mismos:



en la que mCat+ o mAn- es un contraión cargado positiva/negativamente inorgánico u orgánico y

m es un entero de 0 a 3;

10 cada uno de Ra₁ y Ra₂ es independientemente H, SO₃⁻, sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacente;

Rb es arilo opcionalmente sustituido o alquilo opcionalmente sustituido;

cada uno de Rc₁ y Rc₂ es independientemente alquilo o alquilo sustituido; y

cualquiera de Rb o uno de Rc₁ o Rc₂ contiene un grupo funcional de enlace para adhesión adicional o enlace a una molécula adicional.

15 En otra realización los compuestos de la presente divulgación se pueden conjugar con una variedad de unidades estructurales tales como, por ejemplo, nucleósidos, nucleótidos, polinucleótidos, polipéptidos, carbohidratos, ligandos, partículas, células, superficies semisólidas (por ejemplo geles) y superficies sólidas.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación por lo tanto, se proporcionan compuestos colorantes que comprenden grupos de enlace para permitir, por ejemplo, adhesión covalente a dichas unidades estructurales de sustrato.

De acuerdo con un aspecto adicional la divulgación proporciona un compuesto de nucleósido o nucleótido definido por la fórmula: N-L-Dye, en la que N es un nucleótido, L es un grupo funcional enlazador opcional y Dye es un compuesto fluorescente de acuerdo con la presente divulgación.

25 En un aspecto adicional la divulgación proporciona métodos de secuenciación utilizando los compuestos colorantes de la presente divulgación.

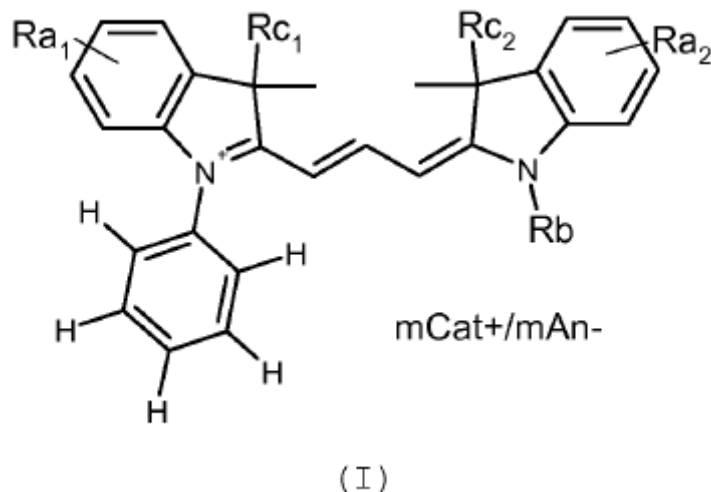
30 De acuerdo con un aspecto adicional la divulgación también proporciona kits que comprenden compuestos colorantes (libres o en forma conjugada) que se pueden utilizar en diversos ensayos inmunológicos, marcado de oligonucleótidos y ácidos nucleicos y para secuenciación de ADN mediante síntesis. En aún otro aspecto la divulgación proporciona kits que comprenden 'grupos' de colorante particularmente adecuados a ciclos de secuenciación mediante síntesis sobre una plataforma de instrumentos automatizada.

Un aspecto adicional de la divulgación es la preparación química de compuestos de la divulgación.

Descripción detallada

Esta divulgación proporciona compuestos colorantes de polimetina novedosos particularmente adecuados para métodos de detección de fluorescencia y secuenciación mediante síntesis.

De acuerdo con un primer aspecto la divulgación proporciona compuestos colorantes de polimetina de la fórmula (I) o forma mesomérica de los mismos:



en la que mCat+ o mAn- es un contraión cargado positiva/negativamente inorgánico u orgánico y

m es un entero de 0 a 3;

cada uno de Ra₁ y Ra₂ es independientemente H, SO₃⁻, sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacente;

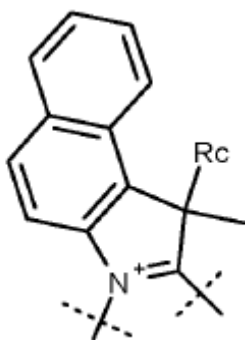
Rb es arilo opcionalmente sustituido o alquilo opcionalmente sustituido;

cada uno de Rc₁ y Rc₂ es independientemente alquilo o alquilo sustituido; y

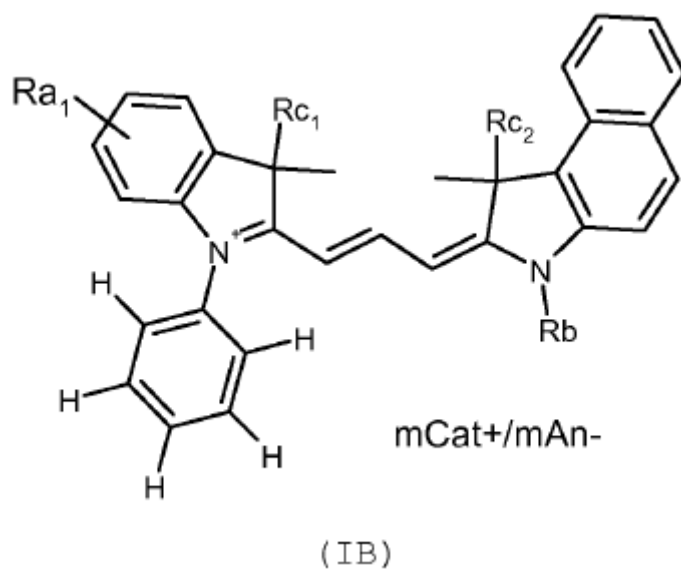
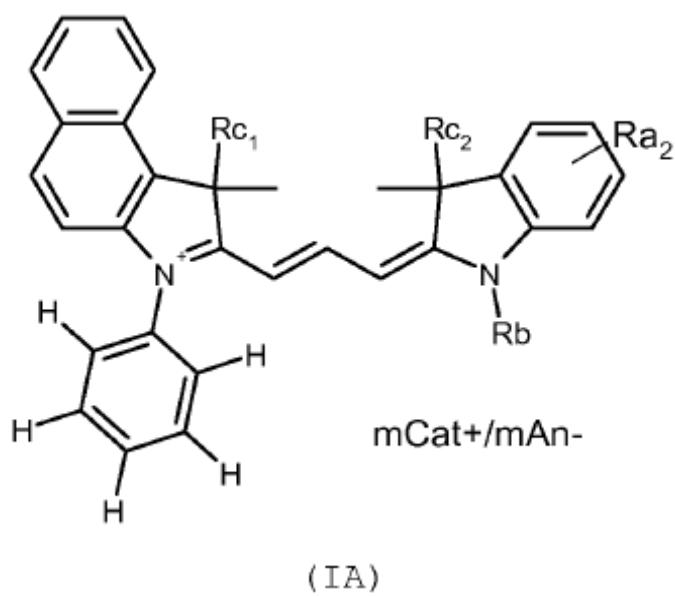
cualquiera de Rb o uno de Rc₁ o Rc₂ contiene un grupo funcional de enlace para adhesión adicional o se une a una molécula adicional.

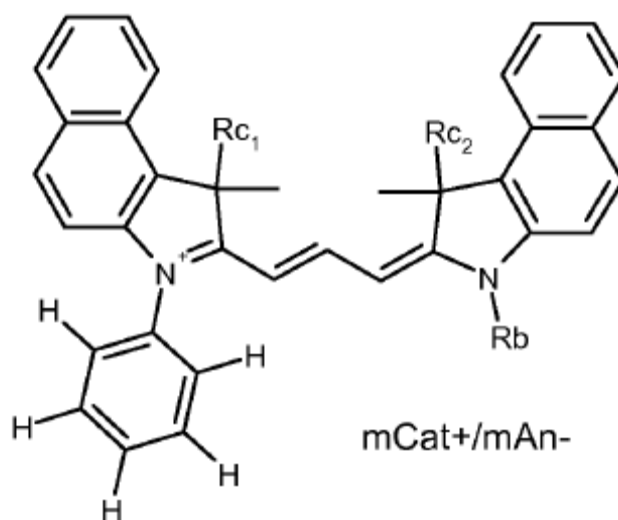
Cada Ra₁ o Ra₂ puede ser independientemente H, SO₃⁻, sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacente. Ra₁ o Ra₂ puede ser H. Ra₁ o Ra₂ pueden ser SO₃⁻. Ra₁ puede ser diferente de Ra₂, por ejemplo la estructura puede tener un grupo de ácido sulfónico sencillo en Ra₁, y H como Ra₂. Ra₁ o Ra₂ puede ser sulfonamida. La sulfonamida puede ser SO₂NH₂ o SO₂NHR, en el que R es un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido

Ra₁ o Ra₂ puede ser un anillo alifático, aromático o heterocíclico adicional fusionado a un carbono adyacente del anillo indol. Por ejemplo, en dichos casos, cuando se fusiona un anillo aromático el grupo de extremo colorante puede representar una estructura de tipo



De esta manera los colorantes de la divulgación se pueden describir por la Fórmula (1A), (IB) o (IC):

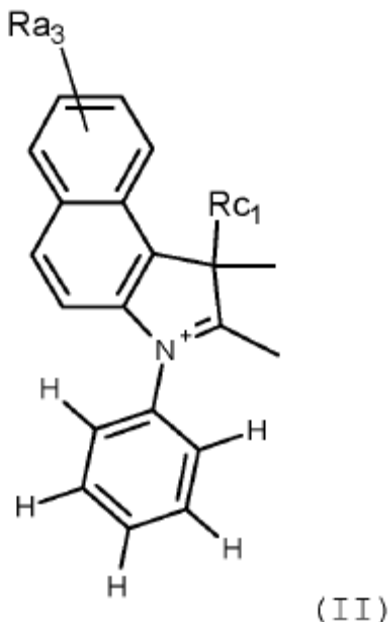




(IC)

En la fórmula (IA), (IB) y (IC) uno o ambos anillos adicionales fusionados a átomos de carbono adyacentes del anillo indol se pueden sustituir opcionalmente, por ejemplo con ácido sulfónico o sulfonamida.

El compuesto puede ser en el que uno de los grupos Ra es un anillo fusionado adicional que forma una estructura de la fórmula (II):



en el que Ra₃ es H, SO₃⁻, sulfonamida o halógeno; y

Rc₁ es alquilo o alquilo sustituido.

Rb puede ser arilo opcionalmente sustituido o alquilo opcionalmente sustituido. Rb puede ser alquilo. Rb puede ser metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo. La cadena alquilo se puede sustituir adicionalmente, por ejemplo con grupos carboxi o sulfónico. El Rb se puede utilizar para conjugación adicional. Por ejemplo si el Rb contiene un grupo funcional COOH, esto se puede conjugar con moléculas adicionales con el fin de adherir el marcador. En el caso de biomolécula, proteína, marcado de ADN y cosas por el estilo, la conjugación se puede llevar a cabo a través de Rb. El Rb puede formar derivados de amida o éster, una vez se ha producido la conjugación. El compuesto se puede adherir a un

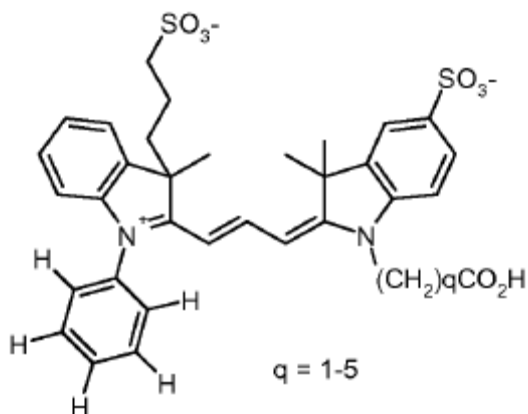
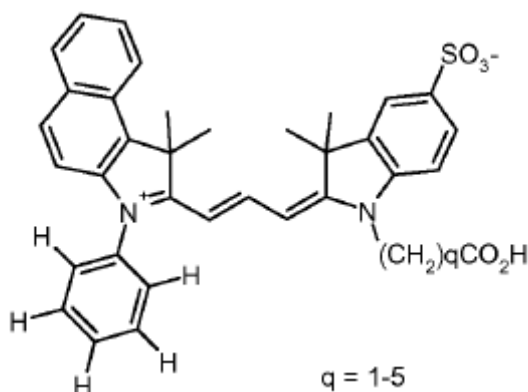
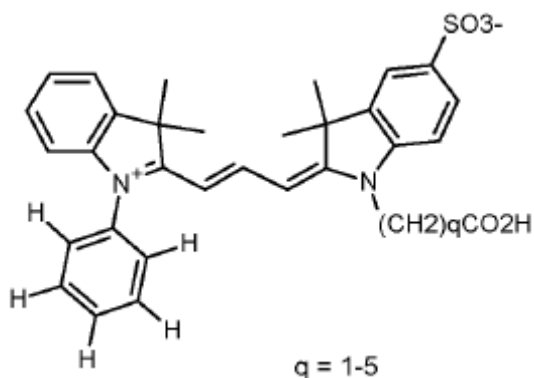
nucleótido u oligonucleótido a través de Rb.

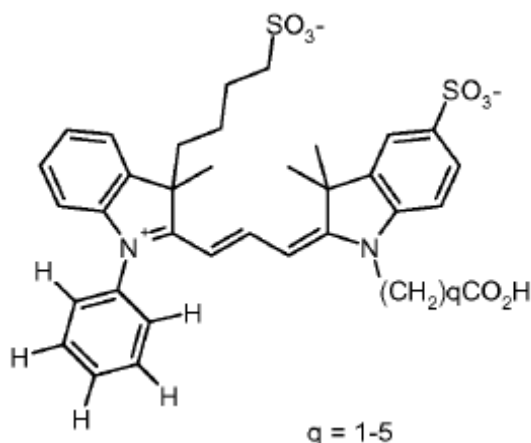
Rb puede ser arilo o arilo sustituido. Rb puede ser fenilo.

5 Cada R_{c1} y R_{c2} puede ser independientemente alquilo o alquilo sustituido. R_{c1} y R_{c2} puede ser metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo o $(CH_2)_qSO_3H$, en el que q es 1 a 6. q puede ser 1-3. R_{c1} y R_{c2} puede ser un grupo alquilo sustituido. R_{c1} y R_{c2} pueden contener un grupo funcional $COOH$ o $-SO_3H$ o sus derivados de éster o amida.

Cualquiera de Rb o R_{c1} o R_{c2} contiene un grupo funcional de enlace para adhesión adicional o se une a una molécula adicional. Rb o R_{c1} o R_{c2} puede contener un grupo funcional carboxi o carboxilato ($COOH$ o COO^-). Una vez ha ocurrido la conjugación, Rb o R_{c1} o R_{c2} puede contener una amida o éster.

Ejemplos de compuestos incluyen: o





o sales de los mismos.

Un compuesto particularmente útil es un nucleótido u oligonucleótido marcado con un colorante como se describe aquí. El nucleótido u oligonucleótido marcado puede tener el marcador adherido a través del grupo alquilo sustituido Rb o Rc₁ o Rc₂. El nucleótido u oligonucleótido marcado puede tener el marcador adherido a la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base de 7-deaza purina a través de un grupo funcional enlazador.

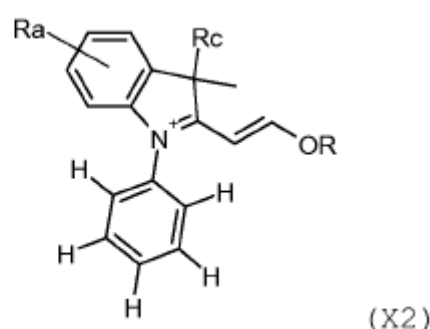
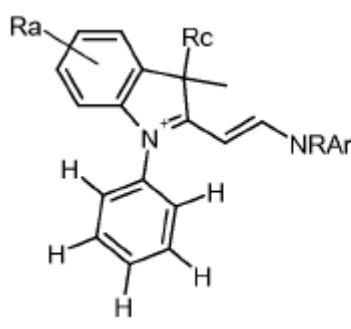
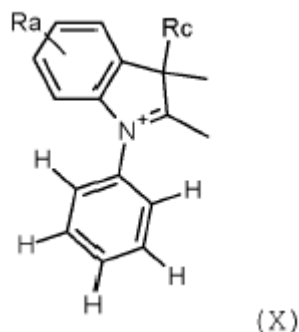
El nucleótido u oligonucleótido marcado también puede tener un grupo de bloqueo unido covalentemente al azúcar de ribosa o desoxirribosa del nucleótido. El grupo de bloqueo se puede adherir en cualquier posición sobre el azúcar de ribosa o desoxirribosa. En realizaciones particulares, el grupo de bloqueo está en la posición 3' OH del azúcar de ribosa o desoxirribosa del nucleótido.

Se proporcionan aquí kits que incluyen dos o más nucleótidos en los que por lo menos un nucleótido es un nucleótido marcado con un compuesto de la presente divulgación. El kit puede incluir dos o más nucleótido marcados. Los nucleótidos se pueden marcar con dos o más marcadores fluorescentes. Se pueden excitar dos o más de los marcadores utilizando una fuente de excitación que puede ser un láser. Por ejemplo, las bandas de excitación para las dos o más marcadores por lo menos se pueden superponer parcialmente de tal manera que la excitación en la región de superposición del espectro provoca que ambas marcadores emitan fluorescencia. En realizaciones particulares, la emisión de las dos o más marcadores puede ocurrir en diferentes regiones del espectro de tal manera que se puede determinar la presencia de por lo menos una de los marcadores al distinguir ópticamente la emisión.

El kit puede contener cuatro nucleótidos marcados, en los que el primero de cuatro nucleótidos se marca con un compuesto como se divulga aquí. En dicho kit, el segundo, tercero, y cuarto nucleótidos cada uno se puede marcar con un compuesto que es opcionalmente diferente del marcador sobre el primer nucleótido y opcionalmente diferente de los marcadores sobre los otros. De esta manera, uno o más de los compuestos pueden tener un máximo de absorbancia distinto y/o máximo de emisión de tal manera que los compuesto(s) se pueden distinguir de otros compuestos. Por ejemplo, cada compuesto puede tener un máximo de absorbancia distinto y/o máximo de emisión de tal manera que cada uno de los compuestos se puede distinguir de los otros tres compuestos. Se entenderá que las partes del espectro de absorbancia y/o espectro de emisión diferentes de la máxima pueden diferir y aquellas diferencias se pueden explotar para distinguir los compuestos. El kit puede ser de tal manera que dos o más de los compuestos tienen un máximo de absorbancia distinto por encima de 600 nm.

Los compuestos, nucleótidos o kits que se exponen aquí se pueden utilizar para detectar, medir o identificar un sistema biológico (que incluye, por ejemplo, procesos o componentes de los mismos). Las técnicas de ejemplo que pueden emplear los compuestos, nucleótidos o kits incluyen secuenciación, análisis de expresión, análisis de hibridación, análisis genético, análisis de ARN, ensayo celular (por ejemplo, unión celular o análisis de función de célula), o ensayo de proteínas (por ejemplo, ensayo de unión de proteína o ensayo de actividad de proteína). El uso puede ser sobre un instrumento automatizado para llevar a cabo una técnica particular, tal como un instrumento de secuenciación automatizado. El instrumento de secuenciación puede contener dos láseres que operan a diferentes longitudes de onda.

Se describe aquí un método para sintetizar compuestos de la divulgación. Un compuesto de la fórmula (X) y/o (X1), (X2) o una sal del mismo se puede utilizar como material de partida para la síntesis de colorantes de polimetina asimétricos o no asimétricos:



en los que Ra es H, SO₃⁻, sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacentes;

Rb es arilo opcionalmente sustituido o alquilo opcionalmente sustituido; y

5 Rc es alquilo o alquilo sustituido.

Como se utiliza aquí, el término "alquilo" se refiere a hidrocarburos C1-C20 y puede incluir anillos carbocíclicos no aromáticos C3-C10. En realizaciones particulares, los grupos alquilo son alquilo C1-C6 que se refieren a radicales saturados, hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que contienen entre uno y seis átomos de carbono, respectivamente. Los grupos alquilo pueden incluir uno o más grupos insaturados, y por lo tanto incluir alqueno y alquino.

10

El término "halógeno" como se utiliza aquí se refiere a fluoro (en lo sucesivo designado como F), cloro (en lo sucesivo designado como Cl), bromo (en lo sucesivo designado como Br) o yodo (en lo sucesivo designado como I), y usualmente se relaciona con la sustitución de un átomo de hidrógeno en un compuesto orgánico, esta sustitución es opcionalmente una sustitución completa para el hidrógeno.

15 El término "alquilo sustituido", se refiere a grupos alquilo, alqueno o alquino como se definió anteriormente en el que pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con, pero no limitado a, halo, ciano, SO₃⁻, Sra, ORa, NRbRc, oxo, CONRbRc, COOH y COORb. Ra, Rb y Rc se pueden seleccionar cada uno independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido. Adicionalmente, dicho alquilo sustituido, alqueno sustituido y alquino sustituido se puede interrumpir opcionalmente por lo menos mediante un heteroátomo o grupo seleccionado entre O, NRb, S(O)_t, donde t es 0 a 2, y similares. El alquilo sustituido también cubre grupos tal como bencilo donde los grupos alquilo comprenden un arilo adicional o un grupo funcional de arilo sustituido.

20

Los colorantes de acuerdo con la presente divulgación se pueden sintetizar a partir de una variedad de diferentes materiales de partida, que incluyen indoles N-fenilo. Los colorantes se pueden hacer de forma simétrica, de tal manera que el mismo es indol está en ambos extremos de la cadena de trimetino o asimétricamente de tal manera que diferentes indoles están en cada extremo del cromóforo. Los métodos para preparar colorantes de polimetina son bien conocidos en la técnica.

25

De acuerdo con un aspecto de la descripción, se proporcionan compuestos de colorantes adecuados para la unión a grupos funcionales de sustrato, particularmente que comprenden grupos de enlace para permitir la unión a grupos funcionales de sustrato. Las unidades estructurales de sustrato pueden ser prácticamente cualquier molécula o sustancia a la que se pueden conjugar los colorantes de la divulgación y, a modo de ejemplo no limitante, pueden incluir nucleósidos, nucleótidos, polinucleótidos, carbohidratos, ligandos, partículas, superficies sólidas, polímeros orgánicos e

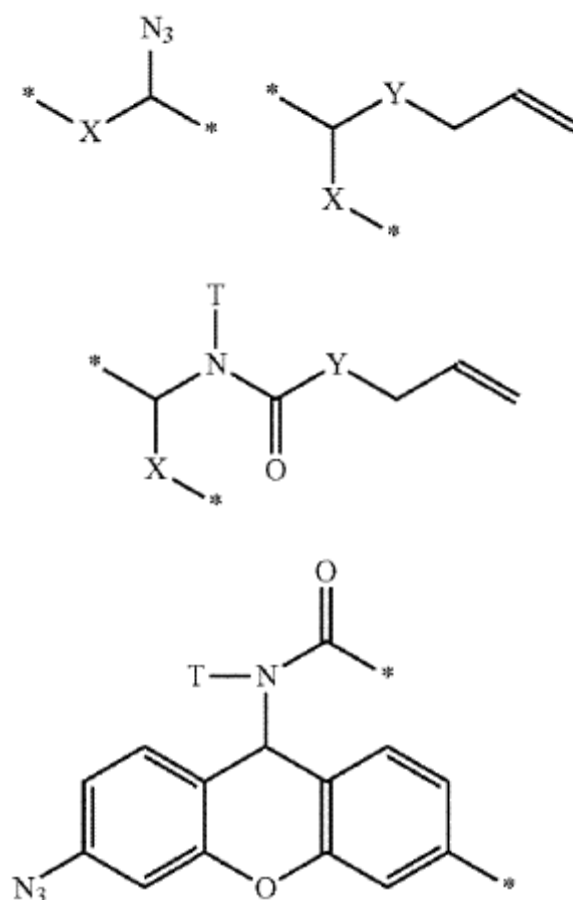
30

inorgánicos, cromosomas, núcleos, células vivas y combinaciones o asociaciones de los mismos. Los colorantes se pueden conjugar mediante un enlazador opcional por una variedad de medios, que incluyen atracción hidrófoba, atracción iónica y unión covalente. Particularmente los colorantes se conjugan con el sustrato mediante unión covalente. Más particularmente, la unión covalente es a través de un grupo enlazador.

- 5 Los colorantes de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir un grupo de enlace reactivo en una de las posiciones de los sustituyentes para la unión covalente del colorante a otra molécula. Los grupos de enlace reactivos son unidades estructurales capaces de formar un enlace (por ejemplo, un enlace covalente o no covalente). En una realización particular, el enlazador puede ser un enlazador divisible. El uso del término "enlazador divisible" no pretende dar a entender que se requiere que todo el enlazador sea eliminado. El sitio de división se puede situar en una posición sobre el enlazador que resulta en parte del enlazador que permanece unido al colorante y/o unidad estructural de sustrato después de división. Los enlaces divisibles pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, enlaces divisibles electrofílicamente, enlaces divisibles enzimáticamente, enlaces divisibles nucleófilamente, enlazadores fotodivisibles, divisible bajo condiciones de reducción (por ejemplo enlaces que contienen disulfuro o azida), condiciones oxidantes, divisibles mediante el uso de enlaces de captura-seguridad y divisible por mecanismos de eliminación. El uso de un enlazador divisible para unir el compuesto colorante a un grupo funcional de sustrato proporciona la opción de eliminar el marcador, por ejemplo después de detección, evitando de este modo cualquier señal de interferencia en las etapas posteriores.

20 Los grupos enlazadores útiles se pueden encontrar en el número de publicación PCT WO2004/018493 (incorporado aquí mediante referencia) cuyos ejemplos incluyen enlazadores que, se pueden dividir utilizando fosfinas solubles en agua o catalizadores de metales de transición solubles en agua formados a partir de un metal de transición y ligandos por lo menos parcialmente solubles en agua. En solución acuosa los últimos forman complejos de metales de transición por lo menos parcialmente solubles en agua. Dichos enlaces divisibles se pueden utilizar para conectar bases de nucleótidos a marcadores tales como los colorantes establecidos aquí.

25 Los enlazadores particulares se pueden encontrar en el número de publicación PCT WO2004/018493 (incorporada aquí mediante referencia), tales como los que incluyen las unidades estructurales de la fórmula:



30 (en la que X se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y NQ en el que Q es un grupo alquilo C1-C10 sustituido o no sustituido, Y se selecciona del grupo que comprende O, S, NH y N(alilo), T es hidrógeno o un grupo alquilo C1-C10

sustituido o no sustituido y * indica donde se conecta el grupo funcional al resto del nucleótido o nucleósido).

En realizaciones particulares, se puede alterar la longitud del enlazador entre un colorante fluorescente (fluoróforo) y una base guanina, por ejemplo, mediante la introducción de un grupo separador de polietilenglicol, aumentando de esta manera la intensidad de fluorescencia en comparación con el mismo fluoróforo unido a la base guanina a través de otros enlaces conocidos en la técnica. Los ejemplos de enlazadores y sus propiedades se exponen en el número de solicitud de patente GB 0517097.2, publicado como WO07020457, (incorporado aquí por referencia). El diseño de enlazadores, y especialmente de su mayor longitud, pueden permitir mejoras en el brillo de los fluoróforos unidos a las bases de guanina de nucleótidos de guanosina cuando se incorporan a polinucleótidos tales como ADN. Por lo tanto, cuando el colorante es para uso en cualquier método de análisis que emplea detección de un marcador de colorante fluorescente unido a un nucleótido que contiene guanina, puede ser ventajoso utilizar un enlazador que tiene un grupo separador de fórmula $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ en la que n es un entero entre 2 y 50, por ejemplo, como se describe en el documento WO07020457.

La presente divulgación proporciona adicionalmente conjugados de nucleósidos y nucleótidos marcados con uno o más de los colorantes establecidos aquí (nucleótidos modificados). Los nucleósidos y nucleótidos marcados son útiles para marcar polinucleótidos formados por síntesis enzimática, tal como, a modo de ejemplo no limitante, en amplificación de PCR, amplificación isotérmica, amplificación de fase sólida, secuenciación de polinucleótidos (por ejemplo secuenciación en fase sólida), reacciones de traducción de mella y similares.

Los nucleósidos y nucleótidos se pueden marcar en sitios sobre el azúcar o nucleobase. Como se conoce en la técnica, un "nucleótido" se compone de una base nitrogenada, un azúcar, y uno o más grupos fosfato. En el ARN el azúcar es 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 pueden ser adenina (A) o guanina (G), y las pirimidinas pueden ser citosina (C), timina (T) o en el contexto del ARN, uracilo (U). El átomo de C-1 de la desoxirribosa se une al N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Un nucleótido es también un éster de fosfato de un nucleósido, con esterificación que ocurre sobre el grupo hidroxilo unido al C-3 o C-5 del azúcar. Los nucleótidos son generalmente mono, di o trifosfato.

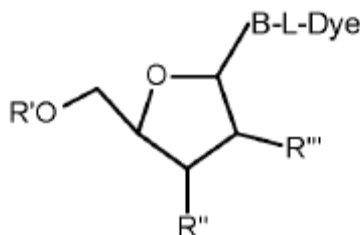
Un "nucleósido" es estructuralmente similar a un nucleótido, pero carece de las unidades estructurales de fosfato. Un ejemplo de un análogo de nucleósido sería uno en el que el marcador se une a la base y no existe ningún grupo fosfato unido a la molécula de azúcar.

Aunque la base se refiere usualmente como una purina o pirimidina, el experto apreciará que están disponibles derivados y análogos que no alteran la capacidad del nucleótido o nucleósido para someterse a emparejamiento de base Watson-Crick. "Derivado" o "análogo" significa un compuesto o molécula cuya estructura central es la misma que, o que se asemeja cercanamente a la de un compuesto original, pero que tiene una modificación química o física, tal como, por ejemplo, un grupo lateral diferente o adicional, que permite que el nucleótido o nucleósido derivado se ligue a otra molécula. Por ejemplo, la base puede ser una desazapurina. En realizaciones particulares, los derivados son capaces de experimentar emparejamiento de Watson-Crick. El "derivado" y "análogo" también incluye, por ejemplo, un nucleótido o nucleósido sintético derivado que tiene unidades estructurales de base modificadas y/o unidades estructurales de azúcar modificadas. Dichos derivados y análogos se discuten en, por ejemplo, Scheit, Nucleotide analogs (John Wiley & Son, 1980) and Uhman et al., Chemical Reviews 90:543-584, 1990. Los nucleótidos análogos también pueden tener enlaces de fosfodiéster modificados que incluyen fosforotioato, fosforoditioato, alquilo-fosfonato, fosforanilidato, fosforamidato y similares.

Un colorante se puede unir a cualquier posición en una base de nucleótidos, por ejemplo, a través de un enlazador. En realizaciones particulares el emparejamiento de base Watson-Crick aún se puede llevar a cabo para el análogo resultante. Los sitios de marcado de nucleobases particulares incluyen la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base 7-desaza purina. Como se describió anteriormente se puede utilizar un grupo de enlace para unir covalentemente un colorante al nucleósido o nucleótido.

En realizaciones particulares, el nucleótido o nucleósido marcado puede ser enzimáticamente incorporable y enzimáticamente extensible. De acuerdo con lo anterior un grupo funcional de enlazador puede tener una longitud suficiente para conectar el nucleótido al compuesto de tal manera que el compuesto no interfiere significativamente con reconocimiento y unión general del nucleótido por una enzima de replicación de ácido nucleico. Por lo tanto, el enlazador también puede comprender una unidad separadora. El separador separa, por ejemplo, la base de nucleótido de un sitio de división o marcador.

Los nucleósidos o nucleótidos marcados con colorantes de la divulgación puede tener la fórmula:



En la que Dye es un compuesto colorante de acuerdo con la presente divulgación, B es una nucleobase, tal como, por ejemplo uracilo, timina, citosina, adenina, guanina y similares y L es un grupo ligador opcional que puede o no puede estar presente. R' puede ser H, monofosfato, difosfato, trifosfato, tiofosfato, un análogo de éster de fosfato, -O- unido a un grupo que contiene fósforo reactivo o -O- protegido por un grupo de bloqueo. R'' puede ser H, OH, una fosforamidita o un grupo de bloqueo 3'OH y R''' es H o OH.

Cuando R'' es fosforamidita, R' es un grupo protector hidroxilo divisible en ácido que permite acoplamiento de monómero posterior bajo condiciones de síntesis automatizada.

En una realización particular el grupo de bloqueo es separado e independiente del compuesto colorante, es decir no directamente unido a este. En una realización alternativa el colorante puede comprender todo o parte del grupo de bloqueo 3'OH. De esta manera R'' puede ser un grupo de bloqueo 3'OH que puede o no puede comprender un compuesto colorante divulgado aquí.

En aún todavía otra realización alternativa no existe grupo de bloqueo sobre el carbono 3' del azúcar pentosa y el colorante (o colorante y construcción de enlazador) unido a la base, por ejemplo, puede tener un tamaño o estructura suficiente para actuar como un bloque para la incorporación de un nucleótido adicional. De esta manera el bloque se puede deber a impedimento estérico o se puede deber a una combinación de tamaño, carga y estructura, ya sea que el colorante se una o no a la posición 3' del azúcar.

En aún todavía otra realización alternativa el grupo de bloqueo está presente sobre el carbono 2' o 4' del azúcar pentosa y puede ser de un tamaño o estructura suficiente para actuar como un bloqueador para la incorporación de un nucleótido adicional.

El uso de un grupo de bloqueo permite que la polimerización sea controlada, tal como al detener la extensión cuando se incorpora un nucleótido modificado. Si el efecto de bloqueo es reversible, por ejemplo a modo de ejemplo no limitante, al cambiar las condiciones químicas o mediante eliminación de un bloque de producto químico, la extensión se puede detener en ciertos puntos y luego se deja continuar.

En otra realización particular un grupo de bloqueo 3'OH comprenderá unidades estructurales divulgadas en el documento WO2004/018497 (incorporadas aquí mediante referencia). Por ejemplo el grupo de bloqueo puede ser azidometil (CH₂N₃) o alilo.

En una realización particular un enlazador (entre colorante y nucleótido) y un grupo de bloqueo ambos están presentes y son grupos funcionales separados. En realizaciones particulares el enlazador y grupo de bloqueo ambos se pueden dividir bajo condiciones sustancialmente similares. De esta manera pueden ser más eficientes los procesos de desprotección y desbloqueo ya que solo se requerirá un único tratamiento para eliminar el compuesto colorante y el bloqueador. Sin embargo, en algunas realizaciones un enlazador y grupo de bloqueo no necesitan ser divisibles bajo condiciones similares, en cambio se pueden dividir individualmente bajo distintas condiciones.

Esta divulgación también abarca polinucleótidos que incorporan compuestos colorantes. Dichos polinucleótidos pueden ser ADN o ARN compuestos respectivamente de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos unidos en el enlace fosfodiéster. Los polinucleótidos de acuerdo con la divulgación pueden comprender nucleótidos de origen natural, nucleótidos no de origen natural (o modificados) diferentes a los nucleótidos modificados de la divulgación o cualquier combinación de los mismos, en combinación con por lo menos un nucleótido modificado (por ejemplo marcado con un compuesto colorante) establecido aquí. Los polinucleótidos de acuerdo con la divulgación también pueden incluir enlaces de estructura principal no naturales y/o modificaciones químicas sin nucleótidos. También se contemplan las estructuras quiméricas compuestas de mezclas de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos que comprenden por lo menos un nucleótido modificado de acuerdo con la divulgación.

Los nucleótidos modificados (o nucleósidos) que comprenden un compuesto colorante de acuerdo con la presente divulgación se puede utilizar en cualquier método de análisis tales como los métodos que incluyen detección de un marcador fluorescente unido a un nucleótido o nucleósido, ya sea por cuenta propia o incorporado en o asociado con una estructura molecular más grande o conjugado. En este contexto el término "incorporado en un polinucleótido" puede

- significar que el fosfato 5' se une en el enlace de fosfodiéster el grupo hidroxilo 3' de un segundo nucleótido (modificado o no modificado), que puede en sí mismo formar parte de una cadena de polinucleótidos más larga. El extremo 3' de un nucleótido modificado establecido aquí se puede o no puede unir en el enlace de fosfodiéster al fosfato 5' de un nucleótido adicional (modificado o no modificado). De esta manera, en una realización no limitante la divulgación proporciona un método para detectar un nucleótido modificado incorporado en un polinucleótido que comprende: (a) incorporar por lo menos un nucleótido modificado de la divulgación en un polinucleótido y (b) detectar el nucleótido modificado(s) incorporado en el polinucleótido al detectar la señal fluorescente desde el compuesto colorante unido a dicho nucleótido modificado(s).
- Este método puede incluir: una etapa de síntesis (a) en la que uno o más nucleótidos modificados de acuerdo con la divulgación se incorporan en un polinucleótido y una etapa de detección (b) en la que uno o más nucleótidos modificado(s) incorporados en el polinucleótido se detectan al detectar o medir cuantitativamente su fluorescencia.
- En una realización de la presente divulgación por lo menos un nucleótido modificado se incorpora en un polinucleótido en una etapa de síntesis por la acción de una enzima de polimerasa. Sin embargo, se pueden utilizar otros métodos para unir los nucleótidos modificados a polinucleótidos, tales como por ejemplo síntesis de oligonucleótido química o ligación de oligonucleótidos marcados a oligonucleótidos no marcados. Por lo tanto, el término "incorporar", cuando se utiliza en referencia a un nucleótido y polinucleótido, puede abarcar síntesis de polinucleótido mediante métodos químicos así como también métodos enzimáticos.
- En una realización específica se lleva a cabo una etapa de síntesis y opcionalmente puede comprender incubar una cadena de polinucleótido plantilla con una mezcla de reacción que comprende nucleótidos modificados marcados fluorescentemente de la divulgación. También se puede proporcionar una polimerasa bajo condiciones que permiten formación de un enlace de fosfodiéster entre un grupo hidroxilo 3' libre sobre una cadena de polinucleótido hibridada a la cadena de polinucleótido plantilla y un grupo fosfato 5' sobre el nucleótido modificado. De esta manera, una etapa de síntesis puede incluir la formación de una cadena de polinucleótido que se dirige por el emparejamiento de base complementario de nucleótidos a una cadena de plantilla.
- En todas las realizaciones del método, la etapa de detección se puede llevar a cabo mientras que se hibrida la cadena de polinucleótido en la que los nucleótidos modificados se incorporan a una cadena de plantilla, o después de una etapa de desnaturalización en la que se separan las dos cadenas. Las etapas adicionales, por ejemplo etapas de reacción química o enzimática o etapas de purificación, se pueden incluir entre una etapa de síntesis y una etapa de detección. En particular, la cadena objetivo que incorpora el nucleótido modificado(s) se puede aislar o purificar y luego procesar adicionalmente o utilizar en un análisis posterior. A modo de ejemplo, los polinucleótidos objetivo marcados con nucleótidos modificado(s) en una etapa de síntesis se pueden utilizar posteriormente como sondas o cebadores marcados. En otras realizaciones el producto de una etapa de síntesis establecido aquí se puede someter a etapas de reacción adicionales y, si se desea, el producto de estas etapas posteriores se puede purificar o aislar.
- Las condiciones adecuadas para una etapa de síntesis serán bien conocidas por aquellos familiarizados con las técnicas de biología molecular convencionales. En una realización, una etapa de síntesis puede ser análoga a una reacción de extensión de cebador estándar utilizando precursores de nucleótidos, que incluyen los nucleótidos modificados establecidos aquí, para formar una cadena objetivo extendida complementaria a la cadena de plantilla en presencia de una enzima polimerasa adecuada. En otras realizaciones una etapa de síntesis puede en sí formar parte de una reacción de amplificación que produce un producto de amplificación de doble cadena marcado compuesto de cadenas complementarias hibridas derivadas de la copia de las cadenas de polinucleótido objetivo y plantilla. Otras etapas de síntesis de ejemplo incluyen la traducción de muesca, polimerización de desplazamiento de cadena, marcado de ADN cebado aleatorio etc. Una enzima polimerasa particularmente útil para una etapa de síntesis es una que es capaz de catalizar la incorporación de uno o más de los nucleótidos modificados establecidos aquí. Se puede utilizar una variedad de polimerasas de origen natural o modificada. A modo de ejemplo, se puede utilizar una polimerasa termoestable para una reacción de síntesis que se lleva a cabo utilizando condiciones de termociclado, mientras que una polimerasa termoestable puede no ser deseable para las reacciones de extensión de cebador isotérmicas. Las polimerasas termoestables adecuadas que son capaces de incorporar los nucleótidos modificados de acuerdo con la descripción incluyen aquellas descritas en los documentos WO 2005/024010 o WO06120433, cada uno de los cuales se incorpora aquí mediante referencia. En las reacciones sintéticas que se llevan a cabo a temperaturas más bajas tales como 37°C, las enzimas de polimerasa no debe ser necesariamente polimerasas termoestables, por lo tanto, la elección de la polimerasa dependerá de una serie de factores tales como temperatura de reacción, pH, actividad de desplazamiento de cadena y similares.
- En realizaciones específicas no limitantes de la divulgación se abarcan métodos de secuenciación de ácido nucleico, resecuenciación, secuenciación del genoma completo, puntuación única de polimorfismo de nucleótidos, o cualquier otra aplicación que implique la detección del nucleótido o nucleósido modificado marcado con colorantes establecidos aquí cuando se incorpora en un polinucleótido. Cualquiera de una variedad de otras aplicaciones que se benefician de la utilización de los polinucleótidos marcados con los nucleótidos modificados que comprenden colorantes fluorescentes pueden utilizar nucleótidos o nucleósidos modificados marcados con colorantes establecidos aquí.

En una realización particular, la divulgación proporciona el uso de nucleótidos modificados que comprenden compuestos de colorantes de acuerdo con la divulgación en una reacción de polinucleótido de secuenciación por síntesis. La secuenciación por síntesis generalmente implica adición secuencial de uno o más nucleótidos u oligonucleótidos a una cadena de polinucleótido en crecimiento en la dirección 5' a 3' utilizando una polimerasa o ligasa con el fin de formar una cadena de polinucleótido extendida complementaria al ácido nucleico plantilla que se va a secuenciar. La identidad de la base presente en uno o más de los nucleótidos agregados se puede determinar en una etapa de detección o de "formación de imágenes". La identidad de la base agregada se puede determinar después de cada etapa de incorporación de nucleótidos. La secuencia de la plantilla luego se puede deducir del uso de reglas convencionales de emparejamiento de bases de Watson-Crick. El uso de los nucleótidos modificados marcados con colorantes establecidos aquí para la determinación de la identidad de una sola base puede ser útil, por ejemplo, en la puntuación de polimorfismos de nucleótido único, y tales reacciones de extensión de base individuales están dentro del alcance de esta divulgación.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de un polinucleótido plantilla se determina al detectar la incorporación de uno o más nucleótidos en una cadena naciente complementaria al polinucleótido plantilla que se va a secuenciar a través de la detección del marcador fluorescente(s) unido al nucleótido(s) incorporado. La secuenciación del polinucleótido plantilla se puede cebar con un cebador adecuado (o preparar como una construcción de horquilla que contendrá el cebador como parte de la horquilla), y la cadena naciente se extiende de una manera escalonada mediante la adición de nucleótidos al extremo 3' del cebador en una reacción de polimerasa catalizada.

En realizaciones particulares de cada uno de los diferentes trifosfatos de nucleótidos (A, T, G y C) se pueden marcar con un fluoróforo único y también comprende un grupo de bloqueo en la posición 3' para evitar la polimerización no controlada. Alternativamente uno de los cuatro nucleótidos se puede marcar (oscuro). La enzima polimerasa incorpora un nucleótido en la cadena naciente complementaria al polinucleótido plantilla, y el grupo de bloqueo evita incorporación adicional de nucleótidos. Cualquier nucleótidos no incorporados se pueden lavar y la señal fluorescente de cada nucleótido incorporado se puede "leer" ópticamente por medios adecuados, tales como un dispositivo acoplado por carga utilizando excitación láser y filtros de emisión adecuados. El grupo de bloqueo 3' y compuestos colorantes fluorescentes luego se pueden eliminar (desprotegido), (simultánea o secuencial) para exponer la cadena naciente para incorporación adicional de nucleótidos. Normalmente, la identidad del nucleótido incorporado se determinará después de cada etapa de incorporación, pero esto no es estrictamente esencial. Del mismo modo, la Patente Estadounidense No. 5,302,509 (que se incorpora aquí mediante referencia) describe un método para secuenciar polinucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido.

El método, como se ejemplificó anteriormente, utiliza la incorporación de la nucleótidos de bloqueo 3' A, G, C y T marcados fluorescentes en una cadena en crecimiento complementaria al polinucleótido inmovilizado, en presencia de polimerasa de ADN. La polimerasa incorpora una base complementaria al polinucleótido objetivo, pero se evita adición adicional por el grupo de bloqueo 3'. Luego se puede determinar el marcador del nucleótido incorporado y el grupo de bloqueo eliminado por división química para permitir que ocurra polimerización adicional. La plantilla de ácido nucleico que se va a secuenciar en una reacción de síntesis mediante secuenciamiento puede ser cualquier polinucleótido que se desea secuenciar. La plantilla de ácido nucleico para una reacción de secuenciación comprenderá normalmente una región de doble cadena que tiene un grupo hidroxilo 3' libre que sirve como un cebador o punto de iniciación para la adición de nucleótidos adicionales en la reacción de secuenciación. La región de la plantilla que se va a secuenciar sobresaltará este grupo hidroxilo 3' libre sobre la cadena complementaria. La región que sobresale de la plantilla que se va a secuenciar puede ser de cadena sencilla, pero puede ser de cadena doble, dado que "se presenta una muesca" en la cadena complementaria a la cadena de plantilla que se va a secuenciar para proporcionar un grupo libre de OH 3' para la iniciación de la reacción de secuenciación. En dichas realizaciones la secuenciación puede proceder por desplazamiento de cadena. En ciertas realizaciones un cebador que lleva el grupo hidroxilo 3' libre se puede agregar como un componente separado (por ejemplo, un oligonucleótido corto) que se hibrida a una región de cadena sencilla de la plantilla que se va a secuenciar. Alternativamente, el cebador y la cadena de plantilla que se va a secuenciar puede cada una formar parte de una cadena de ácido nucleico parcialmente autocomplementaria capaz de formar un dúplex intramolecular, tal como por ejemplo una estructura de bucle en horquilla. Los polinucleótidos de horquilla y métodos mediante los cuales se pueden unir a soportes sólidos se divulgan en los números de publicación de solicitud internacional.

Documentos WO0157248 y WO2005/047301, cada una de las cuales se incorpora aquí mediante referencia. Los nucleótidos se pueden agregar sucesivamente a un cebador creciente, lo que resulta en la síntesis de una cadena de polinucleótido en la dirección 5' a 3'. La naturaleza de la base que se ha agregado se puede determinar, particularmente aunque no necesariamente después de cada adición de nucleótidos, proporcionando de esta manera información de la secuencia de la plantilla de ácido nucleico. Por lo tanto, un nucleótido se incorpora en una cadena de ácido nucleico (o polinucleótido) mediante unión del nucleótido al grupo hidroxilo 3' libre de la cadena de ácido nucleico mediante la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato 5' del nucleótido.

La plantilla de ácido nucleico que se va a secuenciar puede ser ADN o ARN, o incluso una molécula híbrida compuesta de desoxinucleótidos y ribonucleótidos. La plantilla de ácido nucleico puede comprender de nucleótidos origen natural

y/o no naturales y enlaces de de estructura principal naturales o no naturales, siempre que éstos no eviten la copia de la plantilla en la reacción de secuenciación.

En ciertas realizaciones, la plantilla de ácido nucleico que se va a secuenciar se puede unir a un soporte sólido a través de cualquier método de unión adecuado conocido en la técnica, por ejemplo a través de unión covalente. En ciertas realizaciones los polinucleótidos plantilla pueden estar unidos directamente a un soporte sólido (por ejemplo, un soporte a base de sílice). Sin embargo, en otras realizaciones de la divulgación la superficie del soporte sólido se puede modificar de alguna manera para permitir ya sea la unión covalente directa de los polinucleótidos plantilla, o para inmovilizar los polinucleótidos plantilla a través de un hidrogel o polielectrolito de múltiples capas, que puede en sí mismo no estar unido covalentemente al soporte sólido.

Las matrices en las que los polinucleótidos se han unido directamente a los soportes a base de sílice son aquellos, por ejemplo, descritas en el documento WO00006770 (incorporado aquí mediante referencia), en el que los polinucleótidos se inmovilizan sobre un soporte de vidrio mediante reacción entre un grupo epóxido colgante en el cristal con un grupo amino interno en el polinucleótido. Adicionalmente, los polinucleótidos pueden estar unidos a un soporte sólido por reacción de un nucleófilo a base de azufre con el soporte sólido, por ejemplo, como se describe en el documento WO2005/047301 (incorporado aquí mediante referencia). Un ejemplo todavía adicional de polinucleótidos plantilla de soporte sólido es cuando los polinucleótidos plantilla se asocian a hidrogel apoyado sobre soportes a base de sílice u otros soportes sólidos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO00/31148, WO01/01143, WO02/12566, WO03/014392, patente Estadounidense No. 6,465,178 y WO00/53812, cada uno de los cuales se incorpora aquí mediante referencia.

Una superficie particular en la que se pueden inmovilizar los polinucleótidos plantilla es un hidrogel de poliacrilamida. Los hidrogeles de poliacrilamida se describen en las referencias citadas anteriormente y en el documento WO2005/065814, que se incorpora aquí mediante referencia.

Las moléculas de plantilla de ADN se pueden unir a perlas o micropartículas, por ejemplo como se describe en la patente Estadounidense No. 6,172,218 (que se incorpora aquí mediante referencia). La unión a perlas o micropartículas puede ser útil para aplicaciones de secuenciación. Las colecciones de perlas se pueden preparar, cuando cada perla contiene diferentes secuencias de ADN. Las colecciones y métodos para su creación ejemplares se describen en Nature. 437, 376-380 (2005); Science. 309, 5741, 1728-1732 (2005), cada uno de las cuales se incorpora aquí mediante referencia. La secuenciación de las matrices de dichas perlas utilizando los nucleótidos establecidos aquí se encuentra dentro del alcance de la divulgación.

Las plantilla(s) que van a secuenciar, pueden formar parte de una "matriz" sobre un soporte sólido, en cuyo caso la matriz puede tomar cualquier forma conveniente. Por lo tanto, el método de la divulgación es aplicable a todos los tipos de matrices de alta densidad, que incluyen matrices de una sola molécula, matrices agrupadas y matrices de perlas. Los nucleótidos modificados marcados con los compuestos colorantes de la presente divulgación se pueden utilizar para secuenciar plantillas sobre esencialmente cualquier tipo de matriz, que incluye pero no se limita a aquellas formadas por la inmovilización de moléculas de ácido nucleico sobre un soporte sólido.

Sin embargo, los nucleótidos modificados marcados con compuestos colorantes de la divulgación son particularmente ventajosos en el contexto de secuenciación de matrices agrupadas. En las matrices agrupadas, regiones distintas sobre la matriz (a menudo referidos como sitios o características) comprenden múltiples moléculas de plantilla de polinucleótidos. Generalmente, las moléculas de polinucleótidos múltiples no son individualmente resolubles mediante medios ópticos y en cambio se detectan como un ensamble. Dependiendo de cómo se forma la matriz, cada sitio sobre la matriz puede comprender múltiples copias de una molécula de polinucleótido individual (por ejemplo, el sitio es homogéneo para una especie de ácido nucleico diferente de cadena sencilla o doble particular) o incluso copias múltiples de un pequeño número de diferentes moléculas de polinucleótidos (por ejemplo, múltiples copias de dos especies de ácidos nucleicos diferentes). Las matrices agrupadas de moléculas de ácido nucleico se pueden producir utilizando técnicas generalmente conocidas en la materia. A modo de ejemplo, los documentos WO 98/44151 y WO 00/18957, cada uno de los cuales se incorpora aquí, describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos en los que tanto la plantilla como los productos de amplificación permanecen inmovilizados sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas de agrupaciones o "colonias" de moléculas de ácidos nucleicos inmovilizados. Las moléculas de ácido nucleico presentes en las matrices agrupadas preparadas de acuerdo con estos métodos son plantillas adecuadas para la secuenciación utilizando los nucleótidos modificados marcados con los compuestos colorantes de la divulgación.

Los nucleótidos modificados marcados con los compuestos colorantes de la presente divulgación también son útiles en la secuenciación de plantillas en matrices de una sola molécula. El término "matriz de única molécula" o "SMA" como se utiliza aquí se refiere a una población de moléculas de polinucleótidos, distribuidas (o dispuestas) sobre un soporte sólido, en el que la separación de cualquier polinucleótido individual de todos los otros de la población es tal que es posible resolver de forma individual las moléculas de polinucleótidos individuales. Las moléculas de ácido nucleico objetivo inmovilizadas sobre la superficie del soporte sólido pueden por lo tanto ser capaces de ser resueltas por medios ópticos en algunas realizaciones. Esto significa que una o más señales distintas, cada una representando un polinucleótido, se producirán dentro del área resoluble del dispositivo de imagen utilizado en particular.

Se puede lograr detección de moléculas individuales en las que la separación entre las moléculas de polinucleótidos adyacentes en una matriz es de por lo menos 100 nm, más particularmente por lo menos 250 nm, aún más particularmente por lo menos 300 nm, incluso más particularmente por lo menos 350 nm. Por lo tanto, cada molécula individual es resoluble y detectable como un único punto fluorescente de molécula, y la fluorescencia de dicho punto de molécula fluorescente también exhibe solo fotoblanqueamiento de etapa.

Los términos "resuelto individualmente" y "resolución individual" se utilizan aquí para especificar que, cuando se visualizan, es posible distinguir una molécula en la matriz de sus moléculas vecinas. La separación entre las moléculas individuales sobre la matriz se determinará, en parte, por la técnica particular utilizada para resolver las moléculas individuales. Las características generales de las matrices de una sola molécula se comprenderán por referencia a las solicitudes publicadas WO00/06770 y WO 01/57248, cada una de las cuales se incorpora aquí mediante referencia. Aunque un uso de los nucleótidos modificados de la divulgación es en reacciones de secuenciación por síntesis, la utilidad de los nucleótidos modificados no se limita a dichos métodos. De hecho, los nucleótidos se pueden utilizar ventajosamente en cualquier método de secuenciación que requiere la detección de marcadores fluorescentes unidos a nucleótidos incorporados en un polinucleótido.

En particular, los nucleótidos modificados marcados con los compuestos colorantes de la divulgación se pueden utilizar en protocolos de secuenciación fluorescente automatizada, secuenciación de ciclos colorante-terminador particularmente fluorescente basado en el método de secuenciación de terminación de cadena de Sanger y colaboradores. Dichos métodos generalmente utilizan enzimas y secuenciación de ciclos de incorporar didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia en una reacción de extensión de secuenciación del cebador. Los denominados métodos de secuenciación de Sanger y protocolos relacionados (tipo Sanger), utilizan terminación de cadena aleatoria con didesoxinucleótidos marcados.

Por lo tanto, la presente divulgación también abarca nucleótidos modificados marcados con compuestos colorantes que son didesoxinucleótidos que carecen grupos hidroxilo en ambos de las posiciones 3' y 2', dichos didesoxinucleótidos modificados que son adecuados para uso en los métodos de secuenciación tipo Sanger y similares.

Se reconocerán nucleótidos modificados marcados con compuestos colorantes de la presente divulgación que incorporan grupos de bloqueo 3', también pueden ser de utilidad en métodos Sanger y protocolos relacionados debido a que el mismo efecto logrado al utilizar nucleótidos didesoxi modificado se puede lograr al utilizar nucleótidos modificados que tienen grupos de bloqueo 3'-OH: ambos evitan la incorporación de nucleótidos subsiguientes. Cuando los nucleótidos de acuerdo con la presente divulgación, y que tienen un grupo de bloqueo 3' se van a utilizar en los métodos de secuenciación de tipo Sanger, se apreciará que los compuestos colorantes o marcadores detectables unidos a los nucleótidos no necesitan ser conectados a través de conectores divisibles, ya que en cada instancia en la que se incorpora un nucleótido marcado de la divulgación; no existen nucleótidos necesitan ser incorporadas posteriormente y por lo tanto el marcador no necesita ser retirado del nucleótido.

La presente divulgación también proporciona kits que incluyen nucleósidos y/o nucleótidos marcados con colorantes modificados. Dichos kits incluirán generalmente por lo menos un nucleótido o nucleósido modificado marcado con un colorante establecido aquí junto con por lo menos un componente adicional. El componente adicional(s) puede ser uno o más de los componentes identificados en un método establecido anteriormente o en la sección de Ejemplos a continuación. Algunos ejemplos no limitantes de componentes que se pueden combinar en un kit de la presente divulgación se establecen a continuación.

En una realización particular, un kit puede incluir por lo menos un nucleótido modificado o nucleósido marcado con un colorante establecido aquí junto con nucleótidos o nucleósidos modificados o no modificados. Por ejemplo, los nucleótidos modificados marcados con colorantes de acuerdo con la invención se pueden suministrar en combinación con nucleótidos no marcados o nativos, y/o con nucleótidos marcados fluorescentemente o cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con lo anterior, los kits pueden comprender nucleótidos modificados marcados con colorantes de acuerdo con la divulgación y nucleótidos modificados marcados con otra, por ejemplo, compuestos colorantes de la técnica anterior. Las combinaciones de nucleótidos se pueden proporcionar como componentes individuales separados (por ejemplo, un tipo de nucleótidos por recipiente o tubo) o como mezclas de nucleótidos (por ejemplo, dos o más nucleótidos mezclados en el mismo recipiente o tubo).

Cuando los kits comprenden una pluralidad, particularmente dos, más particularmente cuatro, nucleótidos modificados marcados con un compuesto colorante, los diferentes nucleótidos se pueden marcar con diferentes compuestos colorantes, o uno puede ser oscuro, sin compuestos colorantes. Cuando los diferentes nucleótidos se marcan con diferentes compuestos colorantes es una característica de los kits que indican que dichos compuestos colorantes son colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles. Como se utiliza aquí, el término "colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles" se refiere a colorantes fluorescentes que emiten energía fluorescente en longitudes de onda que se pueden distinguir por el equipo de detección fluorescente (por ejemplo, una plataforma de secuenciación de ADN con base capilar comercial) cuando dos o más de dichos colorantes están presentes en una muestra. Cuando dos nucleótidos modificados marcados con compuestos colorantes fluorescentes se suministran en forma de kit, es una característica de algunas realizaciones que los colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles pueden ser

excitados en la misma longitud de onda, tal como, por ejemplo, mediante el mismo láser. Cuando cuatro nucleótidos modificados marcados con compuestos colorantes fluorescentes se suministran en forma de kit, es una característica de algunas realizaciones que dos de los colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles pueden ambos ser se excitados a una longitud de onda y los otros dos colorantes espectralmente distinguibles pueden ambos ser excitados a otra longitud de onda. Las longitudes de onda de excitación particulares son 532 nm, 630 nm a 700 nm, particularmente 660 nm.

En una realización, un kit incluye un nucleótido modificado marcado con un compuesto de la presente divulgación y un segundo nucleótido modificado marcado con un segundo colorante, en el que los colorantes tienen una diferencia en la absorbancia máxima de por lo menos 10 nm, especialmente 20 nm a 50 nm. Más particularmente, los dos compuestos colorantes tienen desplazamientos de Stokes de entre 15 a 40 nm, donde el "desplazamiento de Stokes" es la distancia entre el pico de absorción y las longitudes de onda de emisión de pico.

En una realización adicional un kit puede incluir adicionalmente dos nucleótidos modificados marcados con colorantes fluorescentes en los que los colorantes son excitados por el mismo láser a 600 nm a 700 nm, particularmente 630 nm a 700 nm, más particularmente 660 nm. Los colorantes pueden tener una diferencia en la absorbancia máxima de por lo menos 10 nm, particularmente 20 nm a 50 nm. Más particularmente, los dos compuestos colorantes pueden tener desplazamientos de Stokes entre 20 a 40 nm. Aún todavía más particularmente los dos compuestos colorantes pueden tener una absorbancia máxima diferente por encima de 600 nm, particularmente por encima de 640 nm. Los colorantes particulares que son espectralmente distinguibles de colorantes de polimetina de la presente divulgación y que satisfacen los criterios anteriores son análogos de polimetina como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,268,486 (por ejemplo Cy5) o WO 0226891 (Alexa 647; Molecular Probes A20106) o polimetinas asimétricas como se describe en la patente Estadounidense No. 6,924,372, cada una de las cuales se incorpora aquí mediante referencia.

En una realización alternativa, los kits de la divulgación pueden contener nucleótidos, en los que la misma base se marca con dos compuestos diferentes. Un primer nucleótido se puede marcar con un compuesto de la divulgación. Un segundo de nucleótidos se puede marcar con un compuesto espectralmente distinto, por ejemplo un colorante "rojo" que absorbe por encima de 600 nm. Un tercer nucleótido se puede marcar como una mezcla del compuesto de la divulgación y el compuesto espectralmente distinto, y el cuarto nucleótido puede ser "oscuro" y no contiene marcador. En términos simples, por lo tanto, los nucleótidos 1 a 4 pueden ser marcados 'verde', 'rojo', 'rojo/verde', y oscuro. Para simplificar la instrumentación adicional, se pueden marcar cuatro nucleótidos con un dos colorantes excitados con un solo láser, y por lo tanto el marcado de los nucleótidos 1 4 puede ser 'verde 1', 'verde 2' 'verde 1/verde 2', y oscuro.

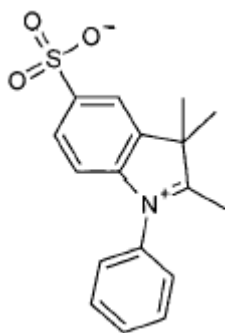
Los nucleótidos pueden contener dos colorantes de la presente divulgación. Los colorantes en los que R_1 y R_4 son H absorben a una longitud de onda más baja que en la que R_1 y R_4 son alquilo. Un kit puede contener dos o más nucleótidos marcados con colorantes de la divulgación. Un kit puede contener un nucleótido marcado con un compuesto de la divulgación en la que R_1 y R_4 son H, y un segundo nucleótido marcado con un compuesto de la divulgación en la que R_1 y R_4 son alquilo. Los kits pueden contener un nucleótido adicional en el que una porción de los nucleótidos se marca con un compuesto de la divulgación en la que R_1 y R_4 son H, y una segunda porción del nucleótido marcado con un compuesto de la divulgación en la que R_1 y R_4 son alquilo. Los kits pueden contener además un nucleótido no marcado. Aunque los kits están ejemplificados anteriormente con respecto a las configuraciones que tienen diferentes nucleótidos que están marcados con diferentes compuestos colorantes, se entenderá que los kits pueden incluir 2, 3, 4 o más nucleótidos diferentes que tienen el mismo compuesto colorante.

En realizaciones particulares de un kit puede incluir una enzima de polimerasa capaz de catalizar la incorporación de los nucleótidos modificados en un polinucleótido. Otros componentes que se incluyen en dichos kits pueden incluir reguladores y similares. Los nucleótidos modificados marcados con colorantes de acuerdo con la invención, y otros componentes de nucleótidos que incluyen mezclas de diferentes nucleótidos, se pueden proporcionar en el kit en una forma concentrada que se diluye antes de uso. En dichas realizaciones, también se puede incluir un regulador de dilución. Una vez más, uno o más de los componentes identificados en un método establecido aquí se puede incluir en un kit de la presente divulgación.

Se observa que, cuando se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que se limite expresa e inequívocamente a un referente. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones a las diversas realizaciones descritas aquí sin apartarse del espíritu o alcance de las presentes enseñanzas. Por lo tanto, se pretende que las diversas realizaciones descritas aquí abarquen otras modificaciones y variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

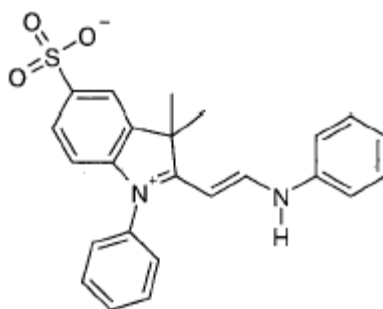
Detalles experimentales

2,3,3-Trimetil-1-fenil-3H-indolio-5-sulfonato (1)

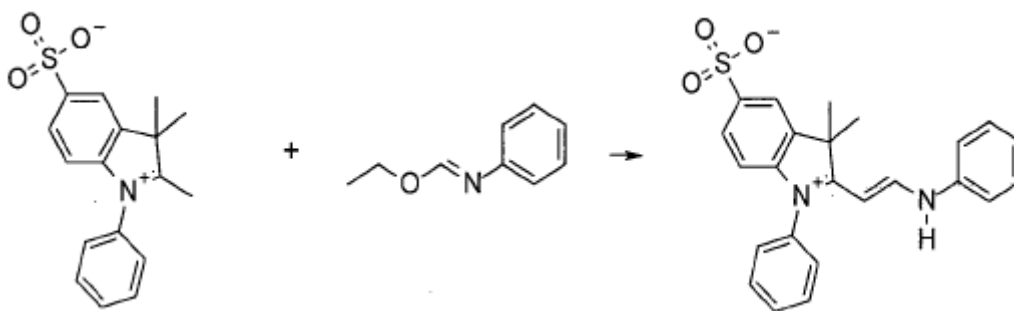


2-Metileno-3,3-trimetil-1-fenil-2,3-dihidro-1H-indol (1 g, 4.25 mmol) se disolvió en 1 ml de ácido sulfúrico a temperatura < 5°C y se agregó 1 ml de ácido sulfúrico fumante (20%) con agitación. La solución se agitó a temperatura ambiente 1 h luego se calentó a 60°C durante 3 h. El producto precipitado con éter de dietilo se lavó con acetona y etanol. Rendimiento 0.7 g (52 %). La estructura se confirmó mediante RMN.

2-(2-Anilinovinil-1)-3,3-trimetil-1-fenil-3H-indolio-5-sulfonato (2-1)

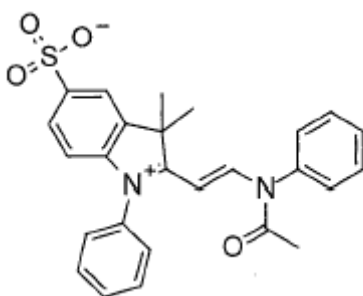


Esquema de reacción:

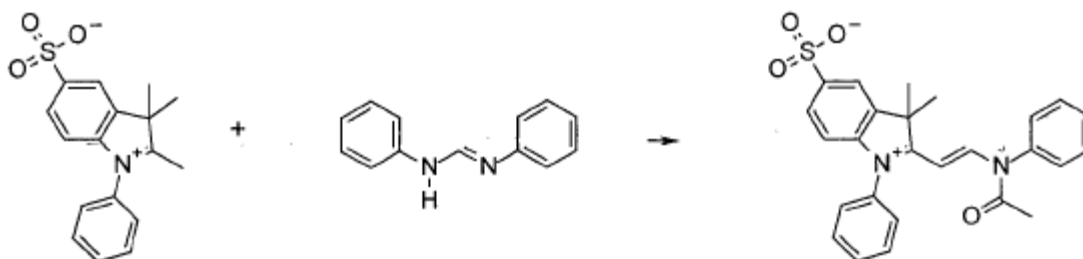


Una mezcla de 2,3,3-trimetil-1-fenil-3H-indolio-5-sulfonato (0.63 g) y N-fenilformimidato de etilo (0.5 g) se calentó a 70°C durante 30 min. Se formó un fundido naranja. El producto se trituró con éter de dietilo y se filtró. Rendimiento 0.7 g (84 %).

2-(2-Acetanilidovinil-1)-3,3-trimetil-1-fenil-3H-indolio-5-sulfonato (2-2)

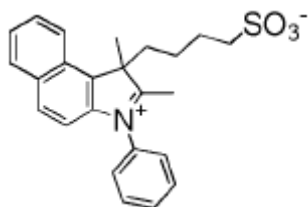


Esquema de reacción:

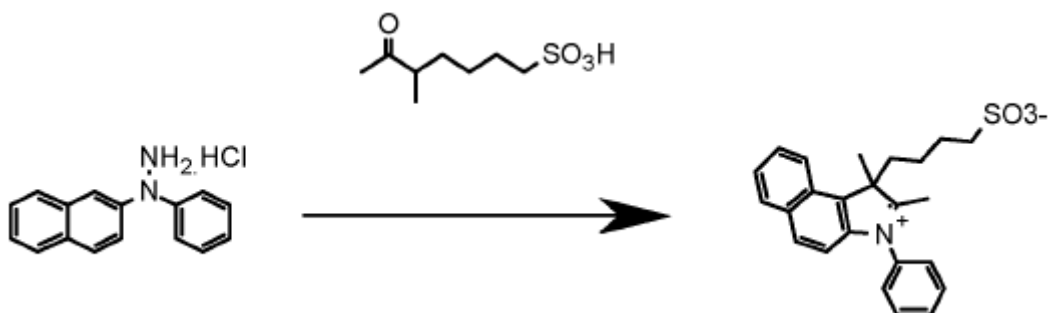


5 Una mezcla de 2,3,3-trimetil-1-fenil-3H-indolio-5-sulfonato (0.63 g), N,N'-difenilformimidina (0.5 g), ácido acético (1 ml) y anhídrido acético (2 ml) se calentó a 70°C durante 3 horas y luego a 50°C durante la noche. Se formó una solución amarilla. El producto se filtró y se lavó con éter de dietilo. Rendimiento 0.69 g (75 %).

1,2-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)-3-fenil-1H-benzo[e]indolio (3)



10 Esquema de reacción:

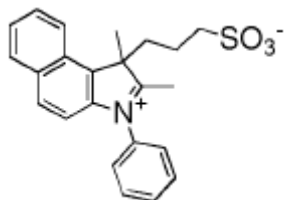


15 Clorhidrato de N-(2-Naftilo),N-fenilhidrazina (19.51 mmol, 5.28 g), ácido 5-metil-6-oxoheptanosulfónico (17.18 mmol, 3.70 g) y ZnCl₂ anhidro (17.18 mmol, 2.34 g) en etanol absoluto (30 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min, luego a 80°C durante 2 h. Se verificó el progreso de la reacción mediante TLC (10% de H₂O en CH₃CN). Después de finalización la reacción se enfrió y el solvente se eliminó bajo vacío. El residuo se disolvió en DCM y se purificó mediante columna flash sobre gel de sílice. Rendimiento: 3.06 g, 42%.

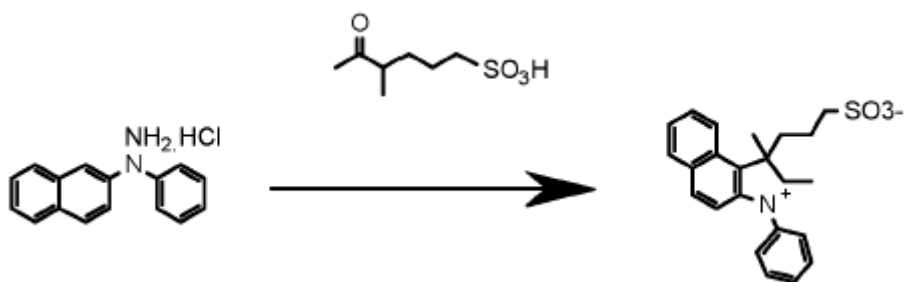
RMN de protón: (MeOH-D₄) : 8.28 (0.5H, d, J = 8Hz); 8.05-8.02 (1H, m); 7.89 (0.5H, d, J = 8Hz); 7.75-7.66 (3H, m); 7.65-7.60 (1H, m); 1.49-1.43 (1.5H, m); 7.31-7.25 (2H, m); 7.16 (.5H, d, J = 9Hz); 7.07 (.5H, appt, J = 7.4Hz); 6.61 (0.5H, d, J = 8Hz); 2.85-2.35 (4H, m); 1.88 (3H, appd, J = 9Hz); 1.75-1.4 (5H, m); 1.35-1.25 (0.5H, m); 1.1-0.95 (0.5H, m); 0.8-

0.65 (0.5H, m); 0.58-0.45 (0.5H, m).

1,2-Dimetil-1-(3-sulfonatopropil)-3-fenil-1H-benzo[e]indolio (4)

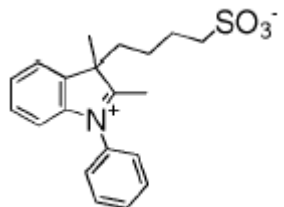


5 Esquema de reacción:

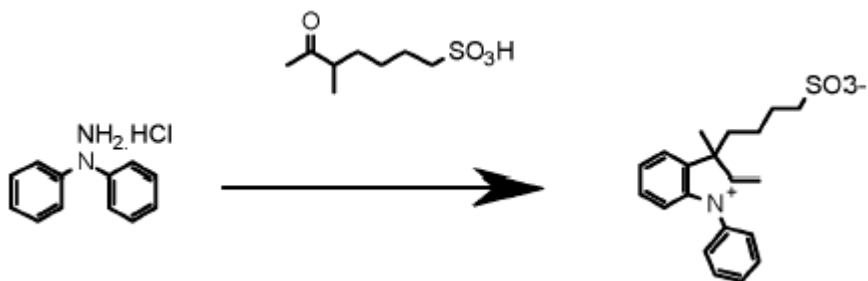


El compuesto del título se preparó como el compuesto previo a partir de clorhidrato N-(2-naftil)-N-fenilhidrazina y ácido 4-metil-5-oxopentanosulfónico. El producto se purificó mediante columna flash sobre gel de sílice. Rendimiento: 40%. Estructura confirmada por espectro de RMN.

10 2,3-Dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-1-fenil-3H-indolio (5)

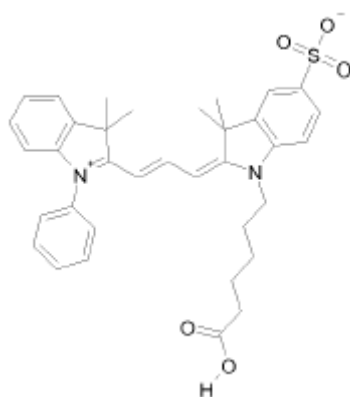


Esquema de reacción:



15 Clorhidrato de N,N-Difenilhidrazina (0.01 mol, 2.2 g), ácido 5-metil-6-oxoheptanosulfónico (0.017 mol, 3.0 g) en ácido acético glacial (20 ml) se agitaron a temperatura ambiente (~20 C) durante una hora luego a 100 C durante 3 horas (verificación TLC). La mezcla de reacción se enfrió y el solvente se eliminó bajo vacío. El residuo se lavó con éter de dietilo y se purificó mediante columna flash sobre gel de sílice. Rendimiento: 2 g (56 %). Estructura confirmada por espectro de RMN.

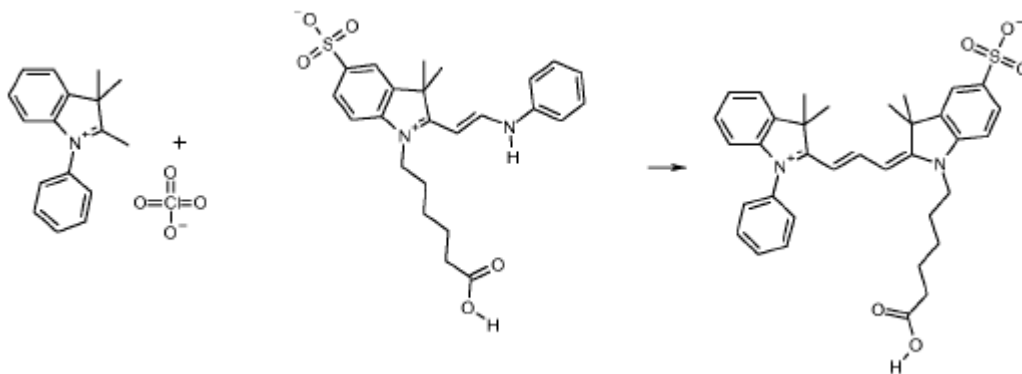
Indocarbocianina I-2 (6)



Nombre químico:

2-((5-[1-phenyl-3,3-dimetil]-1,2-dihidro-3H-indol-2-ilideno]-1-propen-1-il)-3,3-dimetil-1-(5-carboxipentil)-indolio- 5-sulfonato

Esquema de reacción:

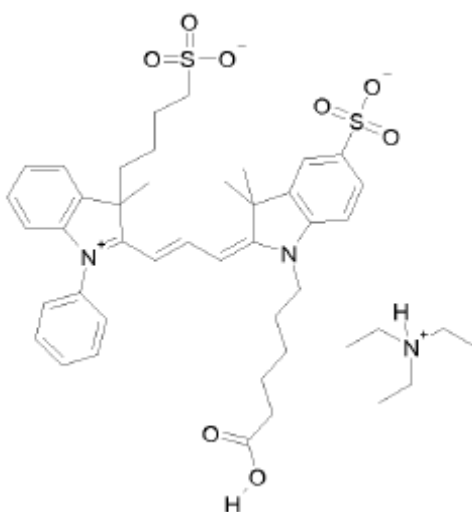


5

10

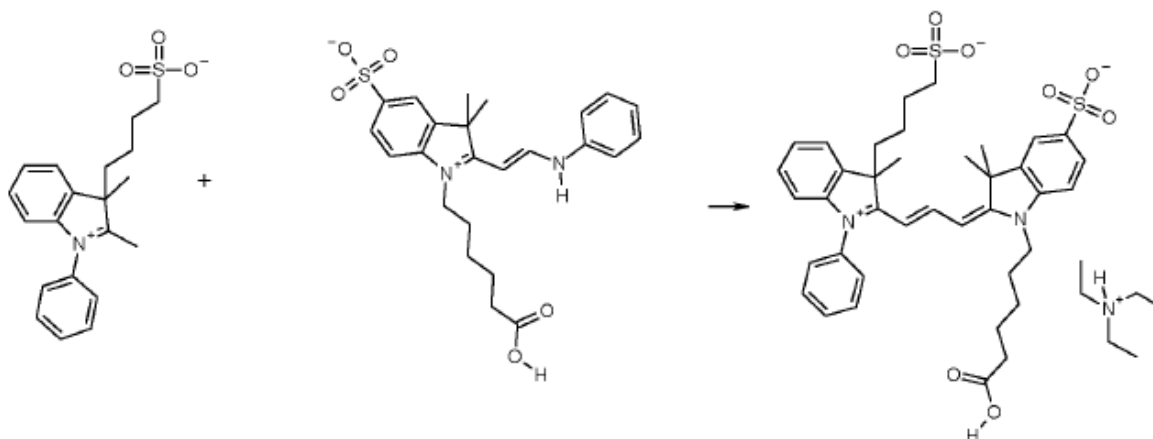
3,3-Dimetil-1-(5-carboxipentil-2-(4-anilinovinil)-3H-indolio-5-sulfonato (0.46 g) y perclorato de 2,3,3-Trimetil-1- fenil-3H-indolio (0.34 g) en mezcla de anhídrido acético (2 ml) y ácido acético (1 ml) se agitaron a temperatura ambiente (~25°C) durante 0.5 hora. Luego a esta solución se agregó piridina (0.5 ml). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 3 h. La terminación de la reacción se verificó mediante TLC (20% de H₂O en CH₃CN) y mediante medición UV. Una vez finaliza la reacción, la mezcla de color rojo se enfrió y los solventes se eliminaron bajo vacío. El residuo se purificó mediante columna flash C18 (TEAB 0.1 M en agua y acetonitrilo). Rendimiento: 0.33 g (55 %).

Indocarbocianina I-4 (7)



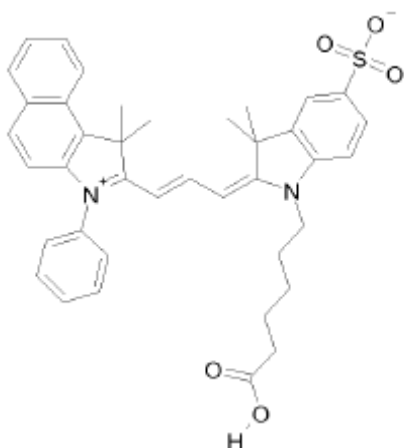
Nombre químico: 2-[(5-[(4-sulfonatobutyl)-1-fenil-3-metil]-1,2-dihidro-3H-indol-2-ilidenol-1-propen-1-il)-3,3-dimetil-1-(5-carboxipentil)-indolio-5-sulfonato de trietilamonio

5 Esquema de reacción:



3,3-Dimetil-1-(5-carboxipentil-2-(4-anilinovinil)-3H-indolio-5-sulfonato (0.46 g) y 2,3-dimetil-3-(4-sulfonatobutyl)-1-fenil-3H-indolio (0.36 g) en mezcla de anhídrido acético (2 ml) y ácido acético (1 ml) se agitaron a temperatura ambiente (~25°C) durante 0.5 hora. Luego a esta solución se agregó piridina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 3 h /se verificó la terminación de la reacción mediante TLC (20% de H₂O en CH₃CN) y mediante medición UV). Una vez finaliza la reacción, la mezcla de color rojo de reacción se enfrió y la mayoría de los solventes se eliminaron bajo vacío. El residuo se purificó mediante columna flash C18 (TEAB 0.1 M en agua y acetonitrilo). Rendimiento: 0.29 g (35 %).

Indocarbocianina I-5 (8)

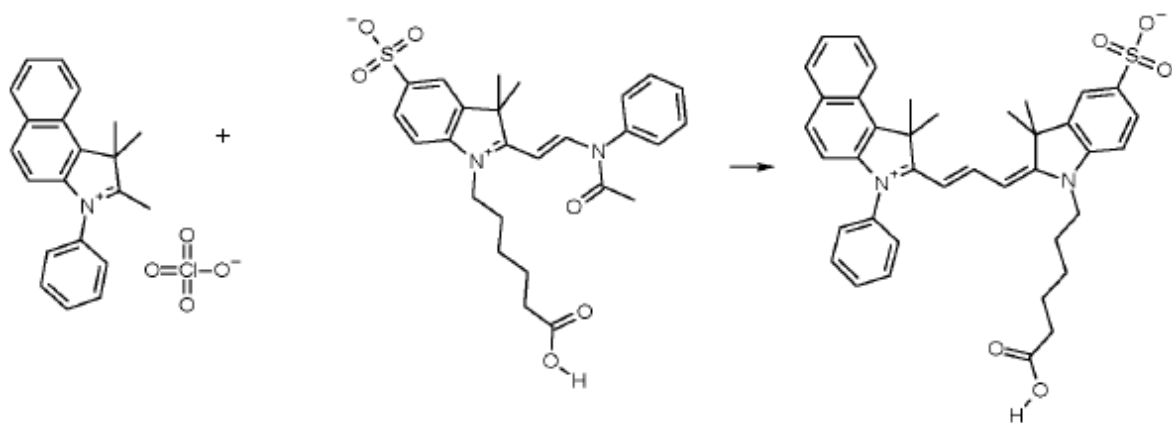


Nombre químico:

2-((5-((3-phenyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-2-ylidene)-1-propen-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(5-carboxipentil)-indolio-5-sulfonato

5

Esquema de reacción:

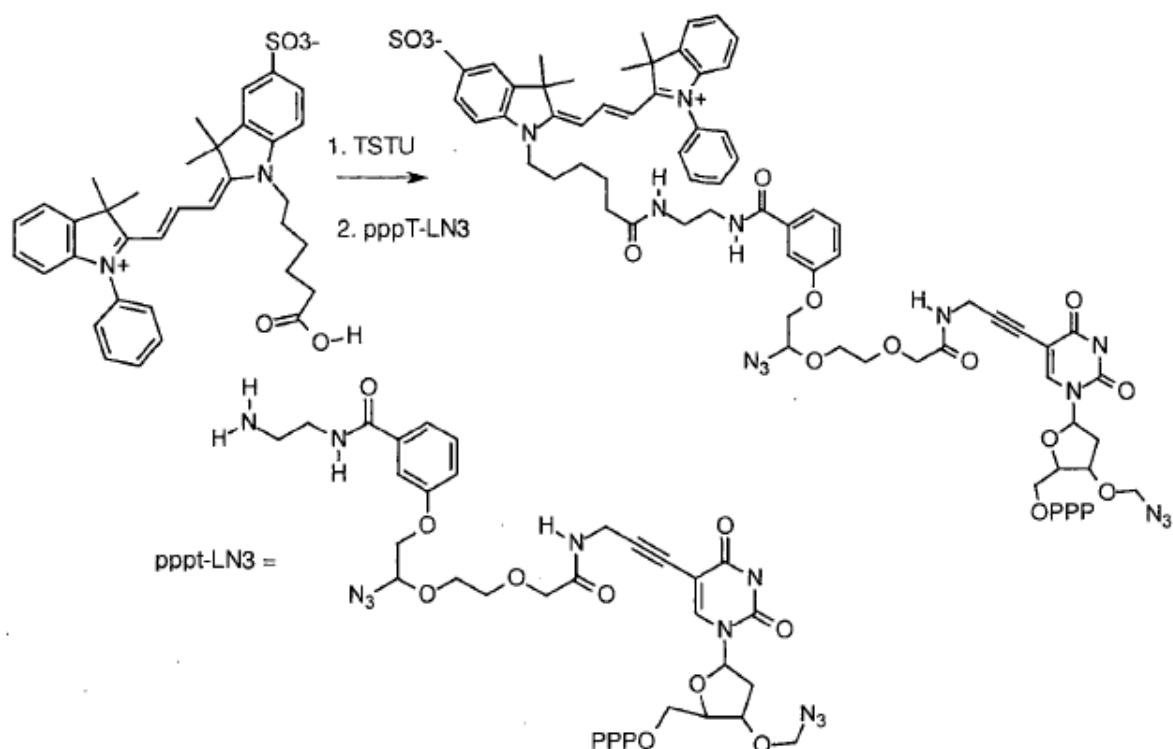


10 3,3-Dimetil-1-(5-carboxipentil-2-(4-anilidovinil)-3H-indolio-5-sulfonato (0.46 g) y perclorato de 1,1,2-trimetil-3- fenil-3H-indolio (0.39 g) en mezcla de anhídrido acético (1 ml) y ácido acético (1 ml) se agitaron a temperatura ambiente (~25°C) durante 0.5 hora. Luego a esta solución se agregó piridina (1 ml) La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 3 h /el progreso de la reacción se verificó mediante TLC (20% en H₂O en CH₃CN)/ y mediante medición UV. Una vez finaliza la reacción, la mezcla de color rojo de reacción se enfrió y la mayoría de los solventes se eliminaron bajo vacío. El residuo se purificó mediante columna flash C18 (TEAB 0.1 M en agua y acetonitrilo). Rendimiento: 0.38 g (54 %).

Conjugado de colorante (I-5-1) pppT-I-2

15

Esquema de reacción:

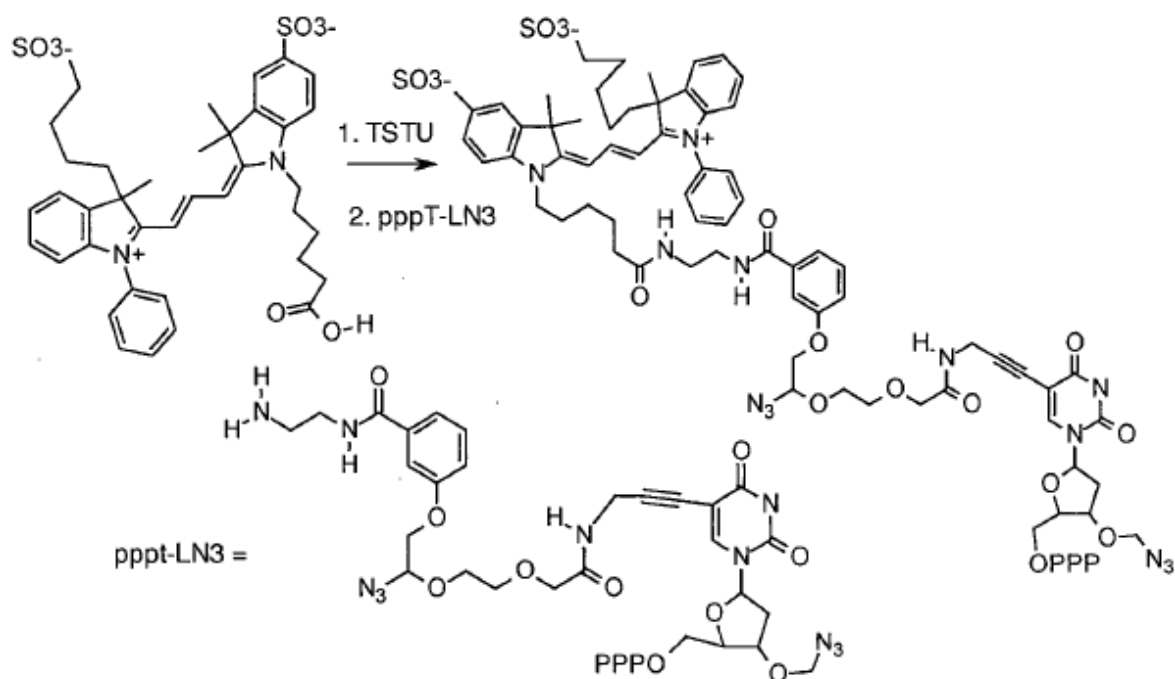


Preparación:

Se agregaron DMA anhidro (5 mL) y Base de Hunig (0.06 mL) a la muestra seca del colorante (I-2) (60 mg). Una solución de TSTU, (0.25 g) en 5 mL de DMA seco luego se agregó a esta. Se desarrolló el color rojo del éster activado. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. De acuerdo con TLC (20% en H₂O en CH₃CN) se contempló la activación. Después de que se completó la activación esta solución se agregó a la solución de pppT-LN3 (0.23 g) en agua (7 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 3 h. El progreso del acoplamiento se verificó mediante TLC (20% en H₂O en acetonitrilo). La mezcla de reacción se enfrió a ~4°C con un baño de hielo, luego se agregó una solución de TEAB 0.1 M (5 mL) en agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se aplicó a columna con ~ 50 g de suspensión de resina sephadex DEAE en solución de TEAB 0.05 M en agua y se lavó con TEAB (gradiente de concentración de 0.1 M hasta 0.5 M). Se recolectaron fracciones coloreadas y se evaporaron luego se coevaporaron de nuevo con agua para eliminar más TEAB y vacío hasta secado. El residuo luego se volvió a disolver en TEAB 0.1 M. Esta solución se filtró a través de un filtro de jeringa 0.2 nm de tamaño de poro en un matraz corning y se almacenó en el congelador. El producto se purificó mediante HPLC utilizando columna de fase inversa C18 con acetonitrilo- TEAB 0.1 M. Rendimiento 67 %.

Conjugado de colorante (I-5-2) pppT-I-4

Esquema de reacción:



Preparación:

Se agregaron DMA anhidro (5 mL) y base de Hunig (0.06 mL) a la muestra seca del colorante (I-2) (82 mg). Una solución de TSTU, (0.25 g) en 5 mL de DMA seco luego se agregó a esta. Se desarrolló sucesivamente color rojo del éster activado. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que se completó la activación (TLC: 15 % en H₂O en CH₃CN) esta solución se agregó a la solución de pppT-LN3 (0.23 g) en agua (7 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a ~4°C con un baño de hielo, luego se agregó una solución de TEAB 0.1 M (5 mL) en agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se aplicó a columna con ~75 g de suspensión de resina sephadex DEAE en solución de TEAB 0.05 M en agua y se lavó con TEAB (gradiente de concentración de 0.10 M hasta 0.75 M). Se recolectaron fracciones coloreadas rojas, el solvente se evaporó y luego el residuo se co-evaporó de nuevo con agua para eliminar más TEAB y vacío hasta secado. El colorante luego se volvió a disolver en TEAB 0.1 M. Esta solución se filtró a través de un filtro de jeringa 0.2 nm de tamaño de poro y el producto se purificó mediante HPLC utilizando columna de fase inversa C18 con acetonitrilo- TEAB 0.1 M. Rendimiento 70%.

Tabla 1

	Colorante	Kd uM	Vmax s ⁻¹	Eficiencia uM ⁻¹ s ⁻¹
pppT	DEG527	4.29	1.67	0.4
pppT	Dy681	0.39	0.88	2.3
pppT	I-2	0.33	1.51	4.5

La Tabla 1 demuestra que la relación de incorporación del trifosfato de 3'-azidometiltimidina marcado con el colorante I-2 es más de 10 veces más rápida en comparación con los análogos de trifosfato de 3'-azidometiltimidina marcados con colorantes alternativos.

Tabla 2

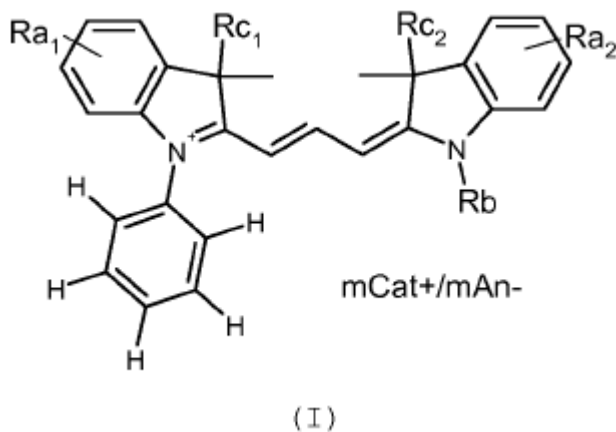
	Pol 217 Kd uM	Pol 957 EA Kd uM
ffT-Deg527	3.00	1.80
ffT oscuro	-	0.55
ffT-I-2	0.25	0.14

La Tabla 2 demuestra que la afinidad de unión de trifosfato de 3'-azidometiltimidina marcado con el colorante I- 2 es más de 10 veces más eficiente en comparación con los análogos de trifosfato de 3'-azidometiltimidina marcados con colorantes alternativos y también es más eficiente que el trifosfato de 3'-azidometiltimidina no marcado.

- 5 Los colorantes como se muestra en el ejemplo I-2 son particularmente ventajosos para las incorporaciones eficientes de sus análogos de nucleótidos marcados. Esto se debe a su mucha mayor afinidad de unión (Kd inferior) a la polimerasa. Los nucleótidos con mayor afinidad de unión se pueden utilizar con la misma eficiencia de incorporación como nucleótidos con afinidades más bajas, pero a una concentración mucho más baja. Por lo tanto, se reduce la cantidad de nucleótidos requerida por ciclo de reactivo de secuenciación, sin reducir la calidad de los datos de secuenciación obtenidos.
- 10

Reivindicaciones

1. Un compuesto de la fórmula (I) o formas mesoméricas del mismo:



en la que mCat+ o mAn- es un contraión cargado positiva/negativamente inorgánico u orgánico y

5 m es un entero de 0 a 3;

cada uno de Ra₁ y Ra₂ es independientemente H, SO₃⁻, sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacente;

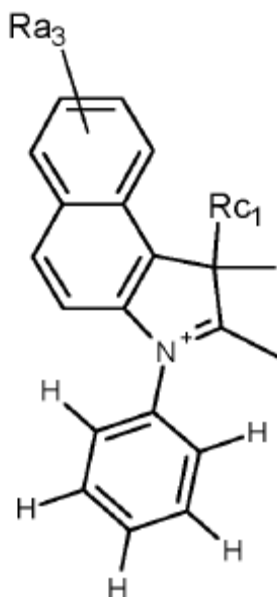
Rb es alquilo o alquilo sustituido con un grupo carboxi o un sulfónico o derivados del mismo;

cada uno de Rc₁ y Rc₂ es independientemente alquilo o alquilo sustituido; y

10 cualquiera de Rb o uno de Rc₁ o Rc₂ contiene un grupo funcional de enlace para adhesión adicional o se une a una molécula adicional.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que Rc₁ o Rc₂ es metilo, etilo, propilo o -(CH₂)_qSO₃⁻ en el que q es 1 a 6.

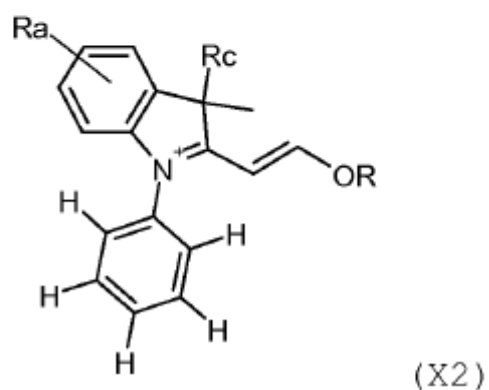
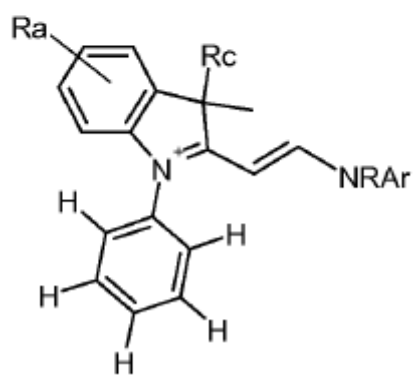
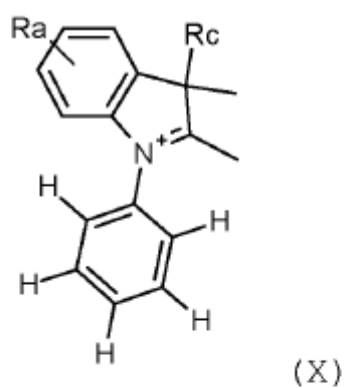
15 3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2 en el que uno de los grupos Ra es un anillo fusionado adicional que forma una estructura de la fórmula (II):



en la que Ra_3 es H, SO_3^- , sulfonamida o halógeno; y

Rc_1 es alquilo o alquilo sustituido.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el grupo funcional de enlace se adhiere a Rb.
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto se adhiere a un nucleótido u oligonucleótido a través de Rb.
6. Un nucleótido u oligonucleótido marcado con un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un nucleótido u oligonucleótido marcado de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el marcador se adhiere a través de un grupo alquilo sustituido Rb.
10. Un nucleótido u oligonucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en el que el marcador se adhiere a la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base de 7-deaza purina a través de un grupo estructural enlazador.
9. Un nucleótido u oligonucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 8, que adicionalmente comprende un grupo de bloqueo 3'OH unido covalentemente al azúcar de ribosa o desoxirribosa del nucleótido.
15. Un kit que comprende dos o más nucleótidos en el que por lo menos un nucleótido es un nucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 9.
11. Un kit de acuerdo con la reivindicación 10 en el que un primero de cuatro nucleótidos es un nucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 10 y el segundo, tercero, y cuarto nucleótidos cada uno se marca con un compuesto diferente, en el que cada compuesto tiene un máximo de absorbancia distinto y cada uno de los compuestos se puede distinguir de los otros tres compuestos.
20. Un kit de acuerdo con la reivindicación 11 en el que un primero de cuatro nucleótidos es un nucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 10 y dos de los compuestos tienen un máximo de absorbancia distinto por encima de 600 nm.
13. Uso de un nucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, un oligonucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 9 o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en secuenciación, análisis de expresión, análisis de hibridación, análisis genético, análisis de ARN o ensayos de unión de proteína.
25. 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 sobre un instrumento de secuenciación automatizado en el que dicho instrumento de secuenciación automatizado comprende dos láseres que operan a diferentes longitudes de onda.
15. Un método para sintetizar un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 utilizando el siguiente material de partida:



o una sal del mismo en La que Ra es H, SO_3^- , sulfonamida, halógeno, o un anillo adicional fusionado a un átomo de carbono adyacente.