(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 642 963**

(51) Int. CI.:

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)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2002 E 10180384 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2338893**

(54) Título: **Nucleótidos marcados**

(30) Prioridad:

04.12.2001 GB 0129012
23.08.2002 US 227131

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BALASUBRAMANIAN, SHANKAR;
BARNES, COLIN;
LIU, XIAOHAI y
SWERDLOW, HAROLD

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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 marcados

Campo de la invención

Esta invención se refiere a nucleótidos marcados. Particularmente, esta invención describe nucleótidos que tienen un marcador removible y su uso en métodos de secuenciación de polinucleótidos.

Antecedentes

Los avances en el estudio de las moléculas se han conducido, en parte, por la mejora de las tecnologías usadas para caracterizar las moléculas o sus reacciones biológicas. Particularmente, el estudio de los ácidos nucleicos ADN y ARN se ha beneficiado a partir de las tecnologías en desarrollo usadas para el análisis de secuencias y el estudio de eventos de hibridación.

Un ejemplo de las tecnologías que han mejorado el estudio de los ácidos nucleicos, es el desarrollo de matrices fabricadas de ácidos nucleicos inmovilizados. Estas matrices consisten típicamente en una matriz de alta densidad de polinucleótidos inmovilizados sobre un material de soporte sólido. Ver, *por ejemplo,* Fodor y otros, *Trends Biotech.*12:19-26, 1994, que describe las formas de ensamblar los ácidos nucleicos usando una superficie de vidrio sensibilizada químicamente protegida por una máscara, pero expuesta en áreas definidas para permitir la unión de fosforamiditas de nucleótidos modificados adecuadamente. Las matrices fabricadas pueden producirse además mediante la técnica de "punteo" de polinucleótidos conocidos sobre un soporte sólido en posiciones predeterminadas (*por ejemplo,* Stimpson y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92*:6379-6383, 1995).

Un desarrollo adicional en la tecnología de matrices es la unión de los polinucleótidos al material de soporte sólido para formar matrices de molécula única. Las matrices de este tipo se describen en la solicitud internacional de patente núm. WO 00/06770.La ventaja de estas matrices es que las reacciones pueden monitorearse a nivel de una molécula única y la información sobre un gran número de moléculas únicas puede recopilarse a partir de una sola reacción.

Para que las matrices de ADN sean útiles, las secuencias de las moléculas deben determinarse. La patente de los EE. UU. núm. 5,302,509 describe un método para secuenciar polinucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido. El método es en base a la incorporación de bases A, G, C y T bloqueadas en 3' que tienen un marcador fluorescente diferente al polinucleótido inmovilizado, en presencia del ADN polimerasa. La polimerasa incorpora una base complementaria al polinucleótido objetivo, pero se impide además la adición por el grupo 3' de bloqueo. El marcaje de la base incorporada puede determinarse y el grupo de bloqueo se elimina por escisión química para permitir que se produzca la polimerización adicional.

Welch y otros (*Chem. Eur. J*. 5(3) :951-960, 1999) describe la síntesis de nucleótidos trifosfatos modificados con un grupo de bloqueo 3'-O- que es fotolábil y fluorescente. Los nucleótidos modificados pretenden usarse en experimentos de secuenciación de ADN. Sin embargo, estos nucleótidos demostraron ser difíciles de incorporarse a un polinucleótido existente, debido a la incapacidad de colocarse en el sitio activo de la enzima polimerasa.

Zhu y otros (*Cytometry* 28:206-211, 1997) describe además el uso de marcadores fluorescentes unidos a un nucleótido a través del grupo base. Los nucleótidos marcados pretenden usarse en experimentos de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), donde se requiere una serie de nucleótidos marcados incorporados para producir un "código de barras" fluorescente.

Los documentos WO00/15844, WO96/11937 y Prober JM et al.; Science (1987); Vol 238, no 4825 páginas 336-341 describen variantes en los terminadores de didesoxinucleótidos usados en la secuenciación electroforética 'Sanger'. Los nucleótidos descritos tienen ambas posiciones 2' y 3' como hidrógeno.

El documento WO99/57321 divulga un método de secuenciación en donde se cuenta el número de nucleótidos incorporados. Con el fin de ser contado, el nucleótido debe tener una porción 3'hidroxilo libre para permitir que se produzcan eventos de incorporación múltiples.

El documento US6136543 divulga un nucleótido con un enlazador fotolábil entre la base y el marcador y un 3'-hidroxilo libre. D5 también divulga por separado un nucleótido con una etiqueta unida a la posición 3' a través de una porción de bloqueo.

Resumen de la invención

En la presente invención, una molécula de nucleósido o nucleótido se enlaza a un marcador detectable a través de un grupo enlazante escindible unido a la base, lo que hace que la molécula sea útil en técnicas que usan nucleósidos o nucleótidos marcados, *por ejemplo,* reacciones de secuenciación, síntesis de polinucleótidos, amplificación de ácidos nucleicos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, estudios de polimorfismo de nucleótido único y otras técnicas

que usan enzimas tales como polimerasas, transcriptasas inversas, transferasas terminales, u otras enzimas modificadoras del ADN. La invención es especialmente útil en técnicas que usan dNTPs marcados, tales como traducción de nick, marcaje de cebadores aleatorios, marcaje final (*por ejemplo,* con desoxinucleotidiltransferasa terminal), transcripción inversa o amplificación de ácido nucleico. Las moléculas de la presente invención son a diferencia de la técnica anterior, donde el marcador está unido a la ribosa o azúcar desoxirribosa, o donde el marcador está unido a través de un enlazador no escindible.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, una molécula de nucleótido o nucleósido, o un análogo de ésta, tiene una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible.

La invención caracteriza una molécula de nucleótido o nucleósido, que tiene una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible. La base puede ser una purina, o una pirimidina. La base puede ser una desazapurina. La molécula puede tener una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa. El azúcar ribosa o desoxirribosa puede incluir un grupo protector unido a través del átomo de oxígeno 2' o 3'. El grupo protector puede eliminarse para exponer un 3'-OH. La molécula puede ser un desoxirribonucleótido trifosfato. El marcador detectable puede ser un fluoróforo. El enlazador puede contener un enlace disulfuro.

La invención caracteriza además un método de marcaje de una molécula de ácido nucleico, donde el método incluye incorporar en la molécula de ácido nucleico una molécula de nucleótido o nucleósido, donde la molécula de nucleótido o nucleósido tiene una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible. La etapa de incorporación puede lograrse a través de una transferasa terminal, una polimerasa o una transcriptasa inversa. La base puede ser una purina, o una pirimidina. La base puede ser una desazapurina. La molécula de nucleótido o nucleósido puede tener una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa. El azúcar ribosa o desoxirribosa puede incluir un grupo protector unido a través del átomo de oxígeno 2' o 3'. El grupo protector puede eliminarse para exponer un grupo 3'-OH. La molécula puede ser un desoxirribonucleótido trifosfato. El marcador detectable puede ser un fluoróforo. El enlazador puede contener un enlace disulfuro. El marcador detectable y/o el enlazador escindible pueden ser de un tamaño suficiente para evitar la incorporación de un segundo nucleótido o nucleósido en la molécula de ácido nucleico.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena simple, donde el método incluye el monitoreo de la incorporación secuencial de nucleótidos complementarios, donde cada nucleótido tiene una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible, y donde la identidad de cada nucleótido incorporado se determina mediante la detección del marcador unido a la base, y posterior eliminación del marcador.

La invención además caracteriza un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo de cadena simple, donde el método incluye:(a) proporcionar nucleótidos, donde los nucleótidos tienen una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible, y donde el marcador detectable unido a cada tipo de nucleótido puede distinguirse por la detección del marcador detectable usado para otros tipos de nucleótidos; (b) incorporar un nucleótido en el complemento del polinucleótido objetivo de cadena simple; (c) detectar el marcador del nucleótido de (b), de ese modo determinar el tipo de nucleótido incorporado; (d) eliminar el marcador del nucleótido de (b); y (e) repetir opcionalmente las etapas (b) - (d) una o más veces, y de ese modo determinar la secuencia del polinucleótido objetivo de cadena simple.

En los métodos descritos en la presente descripción, cada uno de los nucleótidos puede ponerse en contacto con el objetivo secuencialmente, con la eliminación de los nucleótidos no incorporados antes de la adición del siguiente nucleótido, donde la detección y eliminación del marcador y del grupo de bloqueo se lleva a cabo después de la adición de cada nucleótido o después de la adición de los cuatro nucleótidos.

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

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

Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender además una primera etapa y una segunda etapa, donde en la primera etapa, una composición que comprende uno de los cuatro nucleótidos se pone en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y posterior a la eliminación del marcador, y donde en la segunda etapa, una segunda composición que comprende los tres nucleótidos no incluidos en la primera composición se ponen en contacto con el objetivo, y los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la detección y

posterior a la eliminación del marcador, y donde la primera etapa y la segunda etapa pueden repetirse opcionalmente una o más veces.

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

En un aspecto adicional, la invención caracteriza un estuche, donde el estuche incluye: (a) los nucleótidos individuales, donde cada nucleótido tiene una base que está unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible, y donde el marcador detectable unido a cada nucleótido puede distinguirse con la detección del marcador detectable usado para los otros tres nucleótidos, y (b) materiales de envase para estos. El estuche puede incluir además una enzima y los amortiguadores apropiados para la acción de la enzima.

Los nucleótidos/nucleósidos son adecuados para usar en muchas metodologías diferentes basadas en el ADN, que incluyen la síntesis de ADN y los protocolos de secuenciación de ADN.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo comprende monitorear la incorporación secuencial de nucleótidos complementarios, en donde los nucleótidos comprenden un marcador detectable unido a la porción de la base del nucleótido a través de un enlazador escindible, detectar la incorporación mediante el monitoreo del marcador y retirar el marcador para permitir que se produzca la incorporación del nucleótido adicional.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura de un nucleótido ejemplar útil en la invención. Para cada estructura, X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato. R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden seleccionarse de H, OH, o cualquier grupo que puede transformarse en un OH.

La Figura 2 muestra estructuras de enlazadores útiles en la invención, que incluyen (1) enlazadores de disulfuro además de una definición general de los enlazadores que pueden usarse.

La Figura 3 muestra algunas moléculas funcionales útiles en la invención, que incluyen algunos enlazadores escindibles. En estas estructuras, R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser H, OH, o cualquier grupo que puede transformarse en un grupo OH, incluyendo un grupo carbonilo. R_3 representa uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de grupos alquilo, alcoxilo, amino o halógeno.

La Figura 4 muestra un gel desnaturalizante que muestra la incorporación del trifosfato del Ejemplo 1 usando polimerasa Klenow.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a nucleótidos y nucleósidos que se modifican mediante la unión de un marcador a través de un enlazador escindible, lo que hace que la molécula sea útil en técnicas donde la molécula marcada interactúa con una enzima, tales como reacciones de secuenciación, síntesis de polinucleótidos, amplificación de ácidos nucleicos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, estudios de polimorfismo de nucleótido único, técnicas que usan enzimas tales como polimerasa, transcriptasa inversa, transferasa terminal, técnicas que usan dNTPs marcados (*por ejemplo*, traducción de nick, marcaje de cebadores aleatorios, marcaje final (*por ejemplo,* con desoxinucleotidiltransferasa terminal), transcripción inversa o amplificación de ácido nucleico).

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 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 del ARN, uracilo (U)). El átomo C-1 de la desoxirribosa está unido al N-1 de una pirimidina o al N-9 de una purina. Un nucleótido es además un éster de fosfato de un nucleósido, donde la esterificación se produce en el grupo hidroxilo unido al C-5 del azúcar. Los nucleótidos son usualmente mono, di o trifosfatos.

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

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

La presente invención puede hacer uso de los marcadores detectables convencionales. La detección puede llevarse a cabo por cualquier método adecuado, que incluyen espectroscopía de fluorescencia o mediante otros medios ópticos. El marcador preferido es un fluoróforo, el cual, después de la absorción de energía, emite radiación a una longitud de onda definida. Se conocen muchos marcadores fluorescentes adecuados. Por ejemplo, Welch y otros (*Chem. Eur. J.* 5(3):951-960, 1999) describe porciones fluorescentes dansil funcionalizadas que pueden usarse en la presente invención. Zhu y otros (*Cytometry* 28:206-211, 1997) describe el uso de los marcadores fluorescentes Cy3 y Cy5, los cuales pueden usarse además en la presente invención. Marcadores adecuados para usar se describen además en Prober y otros (*Science* 238:336-341,1987); Connell y otros (*BioTechniques* 5(4):342-384, 1987), Ansorge y otros (Nucl. Acids Res. 15(11):4593-4602, 1987) y Smith y otros (Nature 321:674, 1986). Otros marcadores fluorescentes disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina (que incluye TMR, texas red y Rox), alexa, bodipy, acridina, cumarina, pireno, benzantraceno y las cianinas.

Los marcadores múltiples pueden usarse además en la invención. Por ejemplo, casetes FRET bifluoróforo (Tet. Letts.46:8867-8871, 2000) son bien conocidos en la técnica y pueden usarse en la presente invención. Los sistemas dendriméricos multi flúor (*J. Amer. Chem. Soc*.123:8101-8108, 2001) pueden usarse también.

Aunque se prefieren los marcadores fluorescentes, otras formas de marcadores detectables resultarán útiles para aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las micropartículas, que incluyen puntos cuánticos (Empodocles*, y otros*, *Nature* 399:126-130, 1999), nanopartículas de oro (Reichert y otros, *Anal. Chem*.72:6025-6029, 2000), microperlas (Lacoste y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 97 (17):9461-9466, 2000), y marcadores detectables por espectrometría de masas, pueden usarse.

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

El marcador (o el marcador y la construcción del enlazador) puede ser de un tamaño o estructura suficiente para actuar como un bloque para la incorporación de otro nucleótido sobre el nucleótido de la invención. Esto permite que se lleve a cabo la polimerización controlada. El bloque puede deberse al impedimento estérico, o puede deberse a una combinación de tamaño, carga y estructura.

La invención será descrita adicionalmente con referencia a los nucleótidos. Sin embargo, a menos que se indique lo contrario, se pretende que la referencia a los nucleótidos se aplique además a los nucleósidos. La invención se describirá adicionalmente con referencia al ADN, aunque la descripción será aplicable además al ARN, PNA y otros ácidos nucleicos, a menos que se indique lo contrario.

Los nucleótidos modificados de la invención usan un enlazador escindible para unir el marcador al nucleótido. El uso de un enlazador escindible asegura que el marcador puede, si se requiere, retirarse después de la detección, evitando cualquier señal de interferencia con cualquier nucleótido marcado incorporado posteriormente.

Los enlazadores escindibles se conocen en la técnica, y puede aplicarse la química convencional para unir un enlazador a una base de nucleótido y un marcador. El enlazador puede escindirse por la exposición a radicales, metales, agentes reductores o de oxidación. Los enlazadores adecuados pueden adaptarse de los grupos de bloqueo químicos estándar, como se describe en Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons. Los enlazadores de escisión adicionales adecuados que se usan en la síntesis de fase sólida se describen en Guillier y otros (*Chem. Rev*. 100:2092-2157, 2000).

El uso del término "enlazador escindible" no pretende implicar que se requiere el enlazador completo para eliminarse de la base del nucleótido. El sitio de escisión puede situarse en una posición en el enlazador que asegura que parte del enlazador permanece unido a la base del nucleótido después de la escisión.

El enlazador puede unirse en cualquier posición en la base del nucleótido siempre y cuando el apareamiento de base de Watson-Crick aún pueda llevarse a cabo. En el contexto de las bases purinas, se prefiere que el enlazador se una a través de la posición 7 de la purina o el análogo desazapurina preferido, a través de una purina modificada en 8, a través de una adenosina modificada en N-6 o una guanina modificada en N-2. Para las pirimidinas, la unión es preferentemente a través de la posición 5 en la citosina, timidina o el uracilo y la posición N-4 en la citosina. Las estructuras de nucleótidos adecuados se muestran en la Figura 1. Para cada estructura en la Figura 1, X puede ser H, fosfato, difosfato o trifosfato. R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden seleccionarse de H, OH, o cualquier grupo que puede transformarse en un OH, que incluye, pero no se limita al, carbonilo.

Los enlazadores adecuados se muestran generalmente en la Figura 2 e incluyen, pero no se limitan a, enlazadores disulfuro (1), escisión bajo condiciones reductoras, condiciones oxidativas, escisión a través del uso de enlazadores de captura de seguridad y la escisión por mecanismos de eliminación.

D. Escisión bajo condiciones reductoras

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

E. Escisión bajo condiciones oxidativas

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

F. Enlazadores de captura de seguridad

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

G. Escisión por mecanismos de eliminación

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

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

Los nucleótidos modificados pueden comprender además grupos adicionales o modificaciones en el grupo azúcar. Por ejemplo, se puede preparar un derivado de didesoxirribosa, que carece de dos oxígenos en la estructura de anillo de ribosa (en las posiciones 2' y 3'), y puede usarse como un bloque para la incorporación adicional de nucleótidos en una cadena de oligonucleótido en crecimiento. El grupo protector está destinado a prevenir la incorporación de nucleótidos en una cadena de polinucleótidos naciente, y puede eliminarse bajo condiciones definidas para permitir que se produzca la polimerización. A diferencia de la técnica anterior, no hay un marcador detectable unido en la posición 3' de la ribosa. Esto asegura que el impedimento estérico con la enzima polimerasa se reduzca, aunque permite aún el control de la incorporación usando el grupo protector.

El experto apreciará cómo unir un grupo protector adecuado al anillo de ribosa para bloquear las interacciones con el 3'-OH. El grupo protector puede unirse directamente en la posición 3', o puede unirse en la posición 2' (el grupo protector es de tamaño o carga suficientes para bloquear las interacciones en la posición 3'). Como alternativa, el grupo protector puede unirse en ambas posiciones 3' y 2', y puede escindirse para exponer el grupo 3'OH.

Los grupos protectores adecuados resultarán evidentes para el experto, y pueden formarse de cualquier grupo protector adecuado descrito en Green y Wuts, *supra.* El grupo protector debe eliminarse (o modificarse) para producir un grupo 3' OH. El proceso que se usa para obtener el grupo 3' OH puede ser cualquier reacción química o enzimática adecuada.

El enlazador lábil puede consistir en funcionalidad escindible bajo condiciones idénticas para el bloqueo. Esto hará más eficiente el proceso de desprotección ya que sólo se necesitará un solo tratamiento para escindir tanto el marcador como el bloque. De este modo, el enlazador puede contener grupos funcionales como se describió en la Figura 3, los que podrían escindirse con la funcionalidad hidroxilo ya sea en el nucleósido residual o en el marcador eliminado. El enlazador puede consistir además en una funcionalidad química completamente diferente que resulta ser lábil a las condiciones que se usan para escindir el bloque.

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

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

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

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

El término alcoxi se refiere a un alcoxi de C_{1-6} a menos que se indique lo contrario:-OR, en donde R es un grupo alquilo de C_{1-6}.Los ejemplos de grupos alcoxi de C_{1-6} 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) (terc-butoxi).

El término amino se refiere a grupos del tipo NR^1R^2, en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo de C_{1-6} (referido además como alquilamino de C_{1-6} o di alquilamino de C_{1-6}).

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

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

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

Un método para determinar la secuencia de un polinucleótido objetivo puede llevarse a cabo al contactar el polinucleótido objetivo por separado con los diferentes nucleótidos para formar el complemento al aquel del polinucleótido objetivo y detectar la incorporación de los nucleótidos. Tal método usa la polimerización, en la cual una enzima polimerasa extiende la cadena complementaria incorporando el nucleótido correcto complementario al del objetivo. La reacción de polimerización requiere además un cebador específico para iniciar la polimerización.

Para cada ciclo, la incorporación del nucleótido marcado se lleva a cabo por la enzima polimerasa, y después se determina el evento de incorporación. Existen muchas enzimas polimerasa diferentes, y será evidente para la persona con experiencia en la técnica, cuál es la más apropiada para usar. Las enzimas preferidas incluyen la ADN polimerasa I, el fragmento Klenow, ADN polimerasa III, ADN polimerasa T4 o T7, Taq polimerasa o vent polimerasa. Además, puede usarse una polimerasa diseñada mediante ingeniería para tener propiedades específicas.

Los métodos de secuenciación se llevan a cabo preferentemente con el polinucleótido objetivo dispuesto en un soporte sólido. Los polinucleótidos objetivo múltiples pueden inmovilizarse sobre el soporte sólido a través de moléculas enlazantes, o pueden unirse a partículas, *por ejemplo,* microesferas, que pueden unirse además a un material de soporte sólido.

Los polinucleótidos pueden unirse al soporte sólido por una serie de medios, que incluyen el uso de interacciones biotina-avidina. Los métodos para la inmovilización de polinucleótidos sobre un soporte sólido son bien conocidos en la técnica, e incluyen técnicas litográficas y "punteo" de polinucleótidos individuales en posiciones definidas sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen portaobjetos de vidrio y perlas, superficies de silicio y cerámica y materiales plásticos. El soporte es normalmente una superficie plana aunque pueden usarse además perlas microscópicas (microesferas) y a su vez, pueden unirse a otro soporte sólido por medios conocidos. Las microesferas pueden ser de cualquier tamaño adecuado, típicamente en el intervalo de 10 nm a 100 nm de diámetro. En una modalidad preferida, los polinucleótidos se adhieren directamente sobre una superficie plana, preferentemente una superficie de vidrio plana. La unión será preferentemente por medio de un enlace covalente. Preferentemente, las matrices que se usan son matrices de una sola molécula que comprenden polinucleótidos en distintas áreas ópticamente resueltas, *por ejemplo,* como se describe en la solicitud internacional núm. WO 00/06770.

El método de secuenciación puede llevarse a cabo en ambas matrices de una sola molécula de polinucleótido y moléculas de múltiples polinucleótidos, *es decir,* matrices de distintas moléculas de polinucleótido individuales y matrices de regiones distintas que comprenden copias múltiples de una molécula de polinucleótido individual. Las matrices de una sola molécula permiten que cada polinucleótido individual se resuelva por separado. Se prefiere el uso de matrices de una sola molécula. La secuenciación de matrices de una sola molécula permite que se forme una matriz espacialmente direccional no destructiva.

El método hace uso de la reacción de polimerización para generar la secuencia complementaria del objetivo. Las condiciones necesarias para que se produzca la polimerización serán evidentes para el experto.

Para llevar a cabo la reacción de la polimerasa normalmente será necesario hibridar primero una secuencia del cebador con el polinucleótido objetivo, la secuencia del cebador es reconocida por la enzima polimerasa y actúa como un sitio de iniciación para la extensión posterior de la cadena complementaria. La secuencia del cebador puede añadirse como un componente separado con respecto al polinucleótido objetivo. Como alternativa, el cebador y el polinucleótido objetivo pueden ser cada uno parte de una molécula de cadena simple, donde la porción del cebador forma un dúplex intramolecular con una parte del objetivo, *es decir,* una estructura de lazo en horquilla. Esta estructura puede inmovilizarse en el soporte sólido en cualquier punto de la molécula. Otras condiciones necesarias para llevar a cabo la reacción de la polimerasa, que incluyen temperatura, pH, composiciones amortiguadoras, etc., resultarán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica.

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

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

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

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

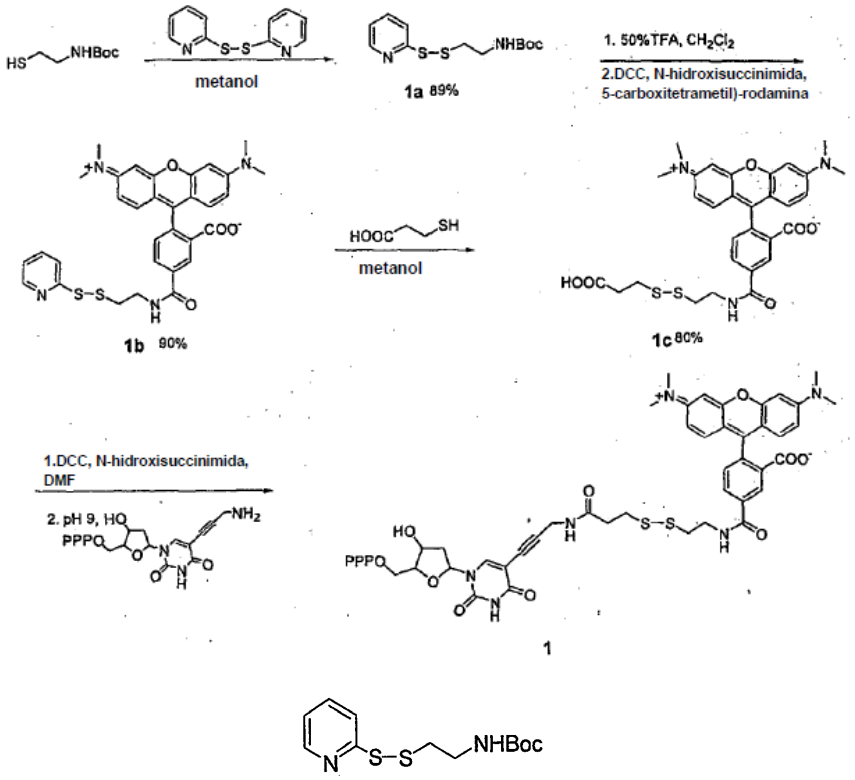
Después de la detección, el marcador puede eliminarse usando condiciones adecuadas que escinden el enlazador.

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

Las estructuras adecuadas se describen en los siguientes Ejemplos y se muestran en las figuras adjuntas.

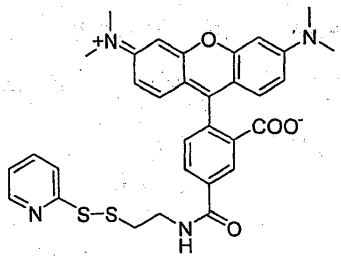
Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de un Enlace Disulfuro.



1a

tButil-N-(2-mercaptoetil) carbamato (3 mmol, 0.5 mL) se añadió gota a gota a una solución de 1.32g (6.0 mmol) de aldritiol en 15 mL de MeOH. Después de 1.5 h la reacción se había completado y el disolvente se evaporó. El producto bruto se purificó por cromatografía sobre sílice con acetato de etilo: éter de petróleo (1:4). El producto 1a se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (0.76 g, 2.67 mmol, 89%). ^{1}H NMR (500 Mhz, D_6-DMSO): d=1.38 (s, 9 H, *t*Bu), 2.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, SCH_2) 3.20 (q, *J* = 6.6 Hz, 2 H, $C\underline{H}_2NH$) , 7.02 (bs, 1 H, NH), 7.24 (ddd, *J* = 7.3 Hz, *J* = 4.9 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, H-5), 7.77 (dt, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, H-3), 7.82 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H, H-4), 8.46 (ddd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 1.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, H-6).

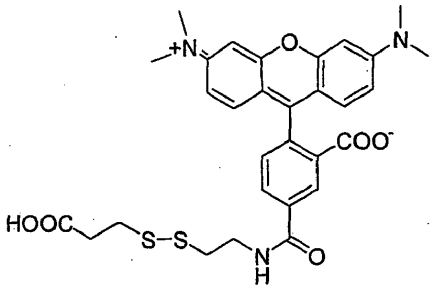


1b

Para desproteger la amina de 1a, se disolvieron 17 mg de 1a (60 µmol) en una mezcla de 0.5 mL de DCM y 0.5 mL de ácido trifluoracético. Esta mezcla se agitó durante 2.5 h a temperatura ambiente y después se eliminaron los disolventes bajo presión reducida. El residuo se disolvió tres veces nuevamente en 2 mL de DCM y se evaporó hasta secarse. El producto desprotegido se secó a alto vacío durante 3 h y después se disolvió en 1 mL de DMF seco. Se asumió que la desprotección se había completado.

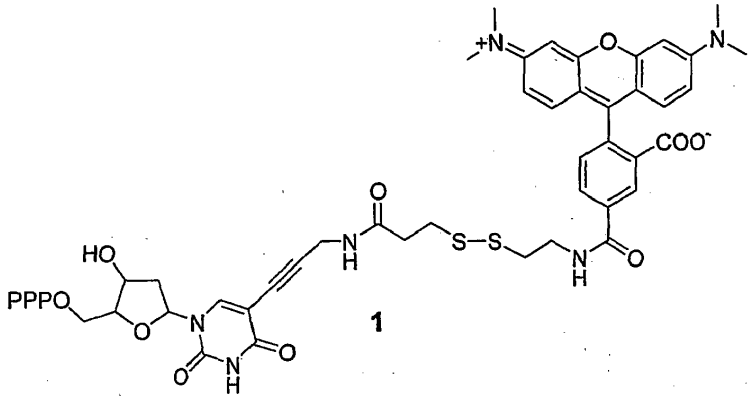
A una solución de 15 mg de 5-carboxi tetrametil rodamina (35 µmol) en 2 mL de DMF se añadieron 8.0 mg de N-hidroxi succinimida (70 µmol) y 7.8 mg DCC (38 µmol). La mezcla se agitó durante 6 h en la oscuridad. Después se añadieron 22 µL de DIPEA (126 µmol) y la solución de desprotección 1a en 1 mL de DMF. Después de agitar la mezcla de reacción toda la noche en la oscuridad, se eliminó el disolvente bajo presión reducida. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con solución saturada de NaCl. Después de secar sobre $MgSO_4$ la mezcla en bruto se purificó sobre sílice con $CHCl_3$:MeOH (3:1) como solvente. Se aisló 1b como un sólido de color rojo oscuro con un rendimiento del 90% (19.2 mg, 31.4 µmol). ^{1}H NMR (500 MHz, D_6-DMSO) : δ = 3.09 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, SCH_2), 3.63 (q, *J* = 6.2 Hz, 2 H, $C\underline{H}_2NH$), 6.48 - 6.53 (m, 6 H, H-Antraceno), 7.23-7.26 [m, 1 H, H-5 (piridina)], 7.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 Hz, H-3), 7.81 - 7.82 [m, 2 H,

H-3 +H-4 (piridina)], 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-4), 8.43 (s, 1 H, H-6), 8.47 [dt, *J* = 4.7 Hz, *J*= 1.3 Hz, 1 H, H-6 (piridina)], 9.03 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H, NH).



1c

Se añadió ácido mercaptopropiónico (20.6µmol, 1.8 mL), a una solución de 19.6 mg de 1b (32.7 µmol) en 2 mL de MeOH. La mezcla se agitó durante 2.5 h en la oscuridad. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía sobre sílice con $CHCl_3$:MeOH:AcOH 15:1:0.5 como la mezcla del solvente. Se pudo aislar 15.5 mg (26 µmol, 80 %) de cristales de color rojo oscuro de 1c. ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 2.53 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, C$\underline{H_2}$COOH), 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, C$\underline{H_2}$CH$_2$COOH), 2.96 - 2.99 (m, 2 H, C$\underline{H_2}$CH$_2$NH), 3.73 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H, C$\underline{H_2}$NH), 6.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 2 H, H-Antraceno), 6.81 (dd, *J* = 9.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 2 H, H-Antraceno), 7.12 (d, *J* = 9.5 Hz, 2 H, H-Antraceno), 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-3), 7.95 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1 H, H-2) 8.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H, H-1).+ve electro pulverización ($C_{30}H_{31}N_3O_6S_2$): esperado 593.17; encontrado 594.3 [M+H], 616.2 [M+Na].



1

A una solución de 25.8 mg de 1c (43.4 µmol) en 3 mL de DMF (seco) se añadió 9.9 mg N-hidroxi succinimida (86.8 µmol) y 9.7 mg de DCC (47.1 µmol). La mezcla se agitó durante 5 h en la oscuridad a temperatura ambiente y después se puso en la nevera durante toda la noche. La mezcla se filtró a través de un tapón de algodón en un nuevo matraz y a esto se añadió una solución de 865 µL de propargilamino dUTP (14.7 µmol, 17 µmol en 1 mL de H_2O) y 3 mL de amortiguador borato sódico (solución 0.1 M, pH 9). La mezcla se agitó toda la noche. Después de la eliminación de los disolventes el residuo se disolvió en tan poca agua como fue posible y se purificó mediante HPLC. Se usó una columna Zorbax C18 con bicarbonato de trietilamonio 0.1 M (TEAB) y acetonitrilo como amortiguadores. ^{31}P NMR (400 MHz, D_2O) : δ = -4.73 (d), -9.93 (d), 19.03 (t).-ve electro pulverización ($C_{42}H_{47}N_6O_{19}P_3S_2$ asumiendo 4 H^+ contra iones): esperado 1096.16; encontrado 1092.9.UV en Agua: $\lambda_{(max)}$ = 555 nm $A_{(555)}$ = 0.885 (c = 0.036 µmol).

Se incorporó satisfactoriamente trifosfato (1) usando ADN polimerasa de Klenow. La reacción se realizó en las siguientes condiciones:50 mM Tris. HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 2µM compuesto 3, 100 nM DNA molde (marcado previamente con P32 y T4 polinucleótido quinasa) y 10 unidades de exo-Klenow comercial (Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois, USA). Los moldes de ADN fueron horquillas auto complementarias (5'-TACCgTCgACgTCgACgCTggCg-AgCgTgCTgCggTTTTT(C6-amino)TTACCgCAgCACgCTCgCCAgCg; Sec. con núm. de ident:1). La reacción se realizó en un volumen de 100 µL a 37 ºC con puntos de tiempo tomados a 0, 1, 3, 5 y 10 min. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (8 M de urea) al 20 % y se formaron imágenes en un PhosphorImager para Typhoon. Se observó una extensión de una sola base completa en 1 minuto que indica una incorporación eficiente de la polimerasa (gel de enlace disulfuro Figura. 4). Un segundo conjunto de carriles se muestra en donde el material se expone al DTT después de la incorporación. Un cambio de banda diferente puede observarse el cual muestra la eliminación del colorante del constructo de ADN, de este modo se ha mostrado un ciclo de incorporación de la polimerasa y de escisión que usa este compuesto de disulfuro.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la extensión de un cebador hibridado a un polinucleótido objetivo, que comprende:

(a) proporcionar al menos un nucleótido que comprende

(1) un marcador fluorescente unido mediante un enlazador a la base de nucleótido, y

(2) un grupo protector Unido al oxígeno 2' o 3' del azúcar nucleótido,

en donde el enlazador puede ser escindido por exposición a radicales, metales, agentes reductores o agentes oxidantes;

(b) extender el cebador hibridado con el nucleótido solamente si la base de nucleótidos es complementaria a la base en la posición correspondiente del polinucleótido objetivo; y

(c) detectar la presencia del marcador en el cebador extendido; detectando así la extensión del cebador.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (a) proporciona cuatro nucleótidos diferentes.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además:

(d) exponer el cebador extendido a radicales, metales, agentes reductores o agentes oxidantes para escindir el marcador fluorescente.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el enlazador y el grupo protector son escindibles bajo condiciones idénticas.

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además:

(d) exponer el cebador extendido a un único conjunto de condiciones de escisión para eliminar el enlazador y el grupo protector.

6. El método de las reivindicaciones 1-5, en donde la base es una purina, pirimidina o deazapurina.

7. El método de las reivindicaciones 1-6, en donde el enlazador escindible comprende una funcionalidad hidroxilo protegida.

8. El método de las reivindicaciones 1-7 en donde el enlazador comprende un sistema alílico escindible.

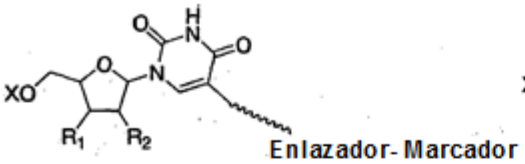
9. El método de las reivindicaciones 1-8 en donde el polinucleótido está unido a un soporte sólido.

10. Un cebador extendido que comprende un nucleótido que tiene una base que está enlazada a un marcador fluorescente a través de un enlazador escindible, en donde la molécula tiene una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa que comprende un grupo protector unido a través del átomo de oxígeno 2' o 3' en donde el enlazador comprende un sistema alílico escindible.

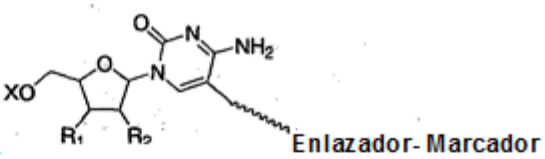
11. Una matriz de cebadores extendidos que comprenden cada uno un nucleótido que tiene una base que está enlazada a un marcador fluorescente a través de un enlazador escindible, en donde la molécula tiene una porción de azúcar ribosa o desoxirribosa que comprende un grupo protector unido a través del átomo de oxígeno 2' o 3' en donde el enlazador comprende un sistema alílico escindible, conteniendo la matriz cuatro nucleótidos diferentes.

12. El cebador extendido de la reivindicación 10 o la matriz de la reivindicación 11, en donde el enlazador y el grupo protector son escindibles bajo condiciones idénticas.

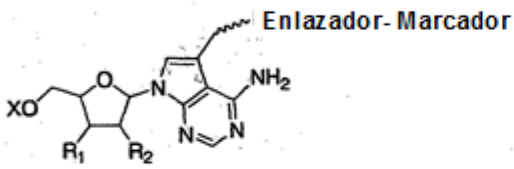
Figura 1



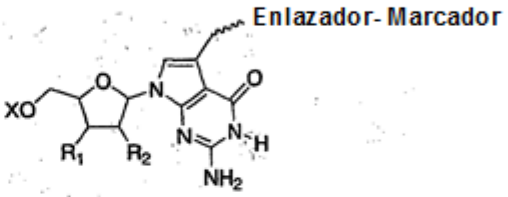
Uridina C5-enlazador



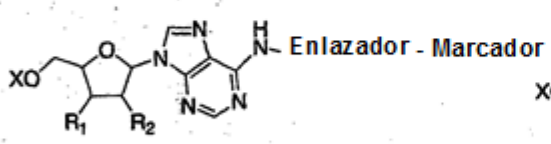
Citidina C5-enlazador



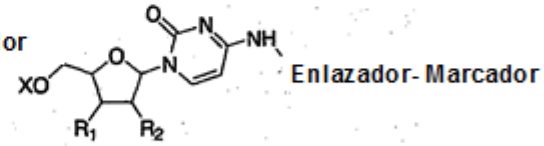
N7 Deazaadenosina C7-enlazador



N7 Deazaguanosina C7-enlazador



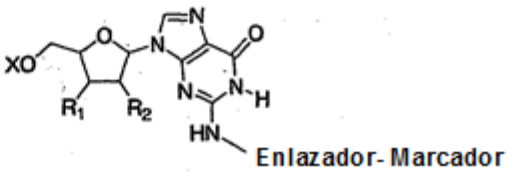
Adenosina N6-enlazador



Citidina N4-enlazador

Donde R_1 y R_2, pueden ser iguales o diferentes, y pueden seleccionarse de H, OH, o cualquier grupo que puede transformarse en un OH.

X = H, fosfato, difosfato o trifosfato



Guanosina N2-enlazador

Figura 2

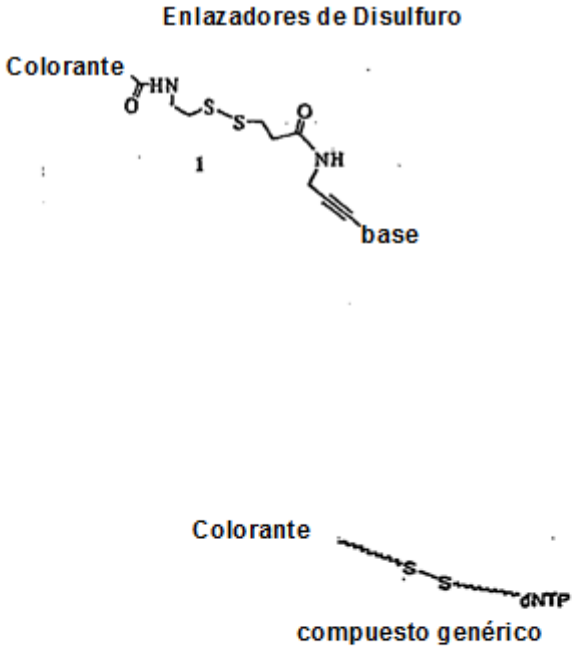
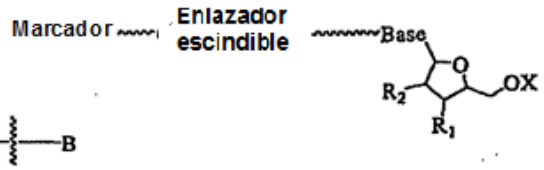
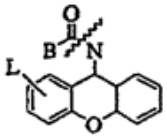

Enlazadores de Disulfuro
Colorante
HN
O
S
S
O
NH
1
base
Colorante
S
S
dNTP
compuesto genérico

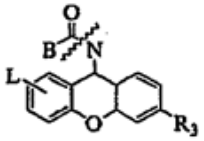
Figura 3

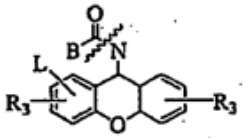


Donde R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser H, OH, o cualquier grupo que puede transformarse en un grupo OH, incluyendo un grupo carbonilo

Los enlazadores escindibles pueden incluir:

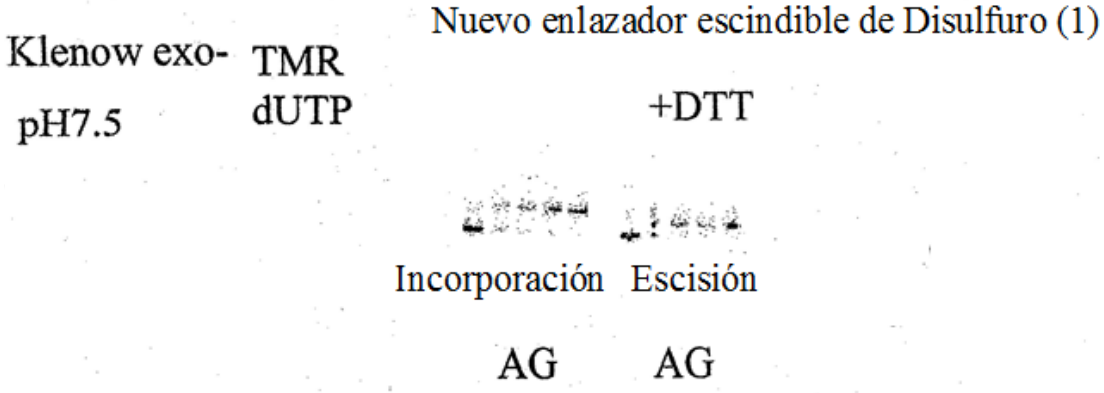






R_3 representa uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de grupos alquilo, alcoxilo, amino o halógeno.

Figura 4



50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA
5mM MgCl2, 2uM dNTP-fluor, 100nM SHP 5T horquilla AG oligo,
Klenow exo- (Amersham-Joyce) 10unidades.

t = 0, 30s, 1,3, 5

ES 2 642 963 T3