

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 004**

51 Int. Cl.:

C07H 19/04 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2014 PCT/US2014/051726**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026845**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2014 E 14837595 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3036248**

54 Título: **Análogos de nucleótidos**

30 Prioridad:

19.08.2013 US 201361867202 P

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

10.02.2021

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

KIM, DAE HYUN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 805 004 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

Análogos de nucleótidos

5 CAMPO DE INVENCION

En la presente se describe tecnología relacionada con la manipulación y detección de ácidos nucleicos, que incluye pero no está limitada a composiciones, métodos y kits relacionados con nucleótidos que comprenden una fracción de enlace químicamente reactiva.

10

ANTECEDENTES

Las metodologías de detección de ácidos nucleicos continúan sirviendo como una herramienta crítica en el campo del diagnóstico molecular. La capacidad de manipular biomoléculas de manera específica y eficiente proporciona la base para muchas tecnologías de detección exitosas. Por ejemplo, enlazar una fracción química, biológica o física (por ejemplo, añadiendo una "etiqueta") a una biomolécula de interés es una tecnología clave relacionada con la posterior manipulación, detección y/o identificación de la biomolécula.

15

20

25

Las tecnologías de enlace convencionales se basan a menudo en métodos asistidos por enzimas. Por ejemplo, algunos métodos para agregar una etiqueta deseada a un ADN objetivo usan una enzima ligasa para unir el ADN objetivo a la etiqueta (por ejemplo, otro fragmento de ADN que comprende la etiqueta, otro fragmento de ADN para servir como la propia etiqueta, etc.). En otro método, una enzima polimerasa incorpora un sustrato modificado con etiqueta de la polimerasa (por ejemplo, un dNTP o un dNTP modificado) en un ácido nucleico. Una ventaja de estos métodos asistidos por enzimas es que los enlaces que unen la biomolécula a la fracción son enlaces "naturales" que permiten una manipulación adicional del producto conjugado. Sin embargo, algunos inconvenientes importantes incluyen bajos rendimientos del producto, reacciones ineficientes y especificidad baja debido a múltiples grupos reactivos presentes en una biomolécula objetivo que la enzima puede reconocer. Adicionalmente, los métodos convencionales tienen altos costes tanto en tiempo como en dinero.

30

Pareek et al., *J Appl Genetics* (2011) 52:413-435 y la US 2011/039259 analizan la secuenciación por síntesis y la secuenciación de próxima generación.

SUMARIO

35

Por consiguiente, en la presente se divulga tecnología relacionada con el enlace de fracciones a biomoléculas usando conjugación química. Estas reacciones de enlace son más específicas y eficientes que las tecnologías convencionales ya que las reacciones están diseñadas para incluir un mecanismo de conjugación entre fracciones químicas específicos.

40

Aunque la mayoría de los enlaces covalentes químicos convencionales no son reconocidos y/o procesados por catalizadores biológicos (por ejemplo, enzimas), lo que limita la posterior manipulación del producto conjugado, la tecnología descrita en la presente proporciona un enlace químico que permite la manipulación descendente del producto conjugado mediante técnicas biológicas y bioquímicas moleculares estándar.

45

50

Por ejemplo, aunque actualmente hay muchos análogos de nucleótidos disponibles que pueden terminar una reacción de polimerasa (por ejemplo, didesoxinucleótidos y varios análogos de nucleótidos 3' modificados), estas moléculas inhiben o limitan severamente la manipulación adicional de ácidos nucleicos terminados por estos análogos. Por ejemplo, las reacciones enzimáticas posteriores, como la reacción en cadena de la polimerasa, son inhibidas completa o sustancialmente por los análogos de nucleótidos. Además, algunas soluciones han utilizado análogos de nucleótidos denominados "terminadores reversibles" en los que los grupos 3' hidroxilo están tapados con una fracción química que puede eliminarse con una reacción química específica, regenerando de este modo un hidroxilo 3' libre. El uso de estos análogos de nucleótidos, sin embargo, requiere el paso de desprotección adicional (destapar) para eliminar la fracción protectora (tapa) del ácido nucleico así como un paso de purificación adicional para eliminar la fracción protectora (que tapa) liberada de la mezcla de la reacción.

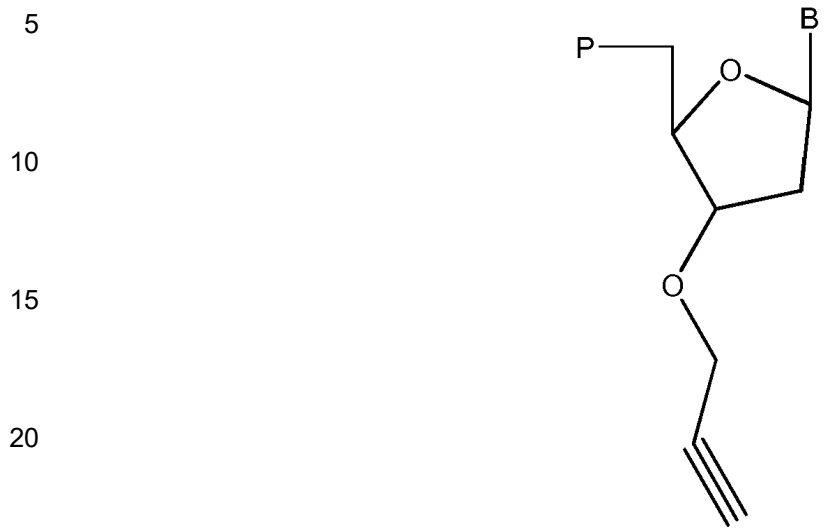
55

60

Al contrario que las tecnologías convencionales, en la presente se divulga tecnología relacionada con el diseño, síntesis y uso de análogos de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos) que comprenden grupos químicamente reactivos. Por ejemplo, algunos casos divulgan un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquino, por ejemplo, un nucleótido que comprende un grupo alquino 3' como se divulga en casos de la tecnología relacionada con un desoxinucleótidos de 3'-O-propargilo. Los grupos y enlaces químicos no deterioran o limitan significativamente el uso de técnicas de biología molecular posteriores para manipular compuestos (por ejemplo, ácidos nucleicos, conjugados y otras biomoléculas) que comprenden los análogos de nucleótidos. Como tales, los compuestos (por ejemplo, ácidos nucleicos, conjugados y otras biomoléculas) que comprenden los análogos de nucleótidos descritos son útiles para muchas aplicaciones.

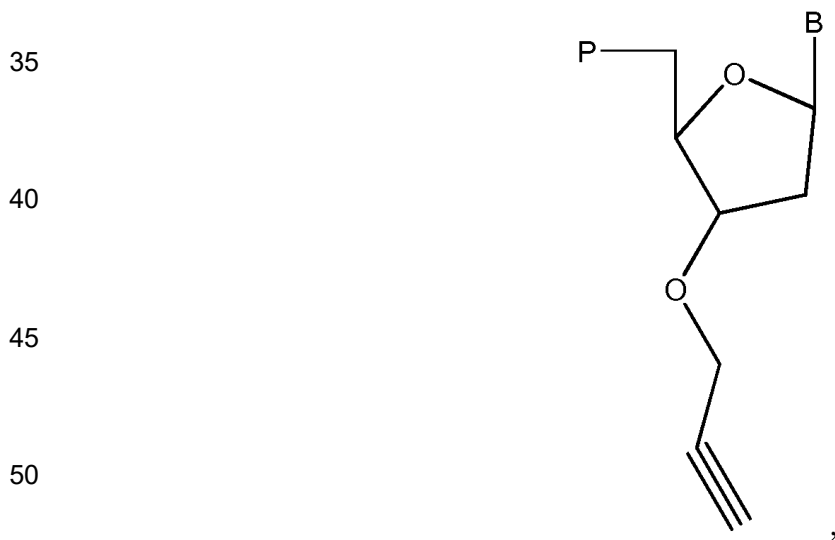
65

La invención proporciona una mezcla de la reacción que comprende una mezcla de dNTP y uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo que tienen una estructura de acuerdo con:



25 en donde B es una base y P comprende una fracción de fosfato, en donde P se selecciona del grupo que consiste de un tetrafosfato, un trifosfato, un difosfato o un monofosfato, y una polimerasa para sintetizar un ácido nucleico usando los dNTP y uno o más análogos de nucleótidos 3'-O-bloqueados.

30 La invención proporciona además una biblioteca de NGS que comprende una pluralidad de ácidos nucleicos, en donde cada ácido nucleico comprende un nucleótido de 3'-O-propargilo que tiene una estructura de acuerdo con:



55 en donde B es una base y P comprende un monofosfato.

La invención también proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico, el método comprendiendo:

- 60
- a) hibridar un cebador con una plantilla de ácido nucleico para formar un complejo cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado;
 - b) proporcionar una pluralidad de análogos de nucleótidos, cada análogo de nucleótido comprendiendo una fracción de alquino, en donde los análogos de nucleótidos son análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo-dNTP que tienen una estructura de acuerdo con:

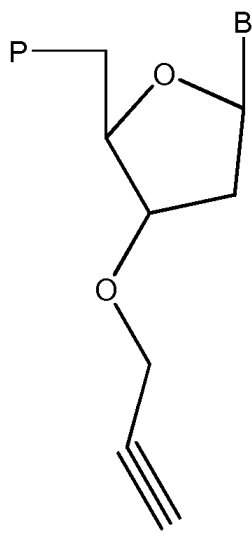
65

5

10

15

20



25

en donde P es un trifosfato y N se selecciona del grupo que consiste de A, C, G, T y U;

c) hacer reaccionar el complejo cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado y el análogo de nucleótido con una polimerasa para añadir el análogo de nucleótido al cebador mediante una reacción de polimerasa para formar un producto ampliado que comprende un análogo de nucleótido incorporador; y

d) hacer reaccionar el producto ampliado con un compuesto que contiene azida para formar una estructura que comprende un anillo de triazol.

30

En algunos casos, los análogos de nucleótidos encuentran uso como terminadores de nucleótidos funcionales, es decir, los análogos de nucleótidos terminan la síntesis de un ácido nucleico por una polimerasa y comprenden adicionalmente un grupo reactivo funcional para los posteriores procesamiento, reacción y/o manipulación químicos y/o bioquímicos. En particular, algunos casos proporcionan un análogo de nucleótido en el que el grupo 3' hidroxilo está tapado por una fracción química que comprende, por ejemplo, un alquino (por ejemplo, un enlace triple carbono-carbono, por ejemplo, C≡C). Cuando el análogo de nucleótido de alquino 3' se incorpora en un ácido nucleico por una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa de ADN y/o de ARN) durante la síntesis, el alargamiento adicional del ácido nucleico se detiene ("termina") porque el ácido nucleico no tiene un hidroxilo 3' libre para proporcionar un sustrato apropiado para la posterior adición de nucleótidos.

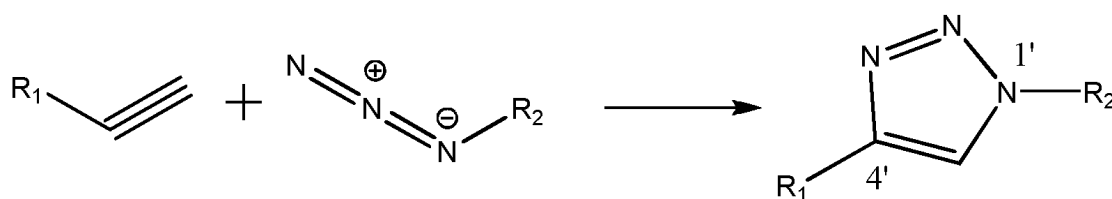
35

40

Aunque los análogos de nucleótidos no son un sustrato natural para las enzimas biológicas moleculares convencionales, la fracción química de alquino es un compañero de conjugación química bien conocido que reacciona con fracciones funcionales particulares. Por ejemplo, un alquino reacciona con un grupo azida (por ejemplo, N₃, por ejemplo, N=N=N) en una reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (I) ("CuAAC") para formar dos nuevos enlaces covalentes entre nitrógenos de azida y carbonos de alquino. Los enlaces covalentes forman un enlace químico (por ejemplo, que comprende un anillo de triazol de cinco miembros) entre un primer componente y un segundo componente que comprende las fracciones de azida y alquino antes del enlace. Este tipo de reacción de cicloadición es una de las reacciones fundamentales de la "química clic" porque proporciona un rendimiento químico deseable, es fisiológicamente estable, y muestra una gran fuerza de impulsión termodinámica que favorece una reacción "cargada por resorte" que produce un único producto (por ejemplo, un 1,4-regioisómero de 1,2,3-triazol). Véase, por ejemplo, Huisgen (1961) "Centenary Lecture-1,3-Dipolar Cycloadditions", Proceedings of the Chemical Society of London 357; Kolb, Finn, Sharpless (2001) "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions", Angewandte Chemie International Edition 40(1): 2004-2021. Por ejemplo:

55

60



donde R₁ y R₂ son individualmente cualquier estructura química o fracción química.

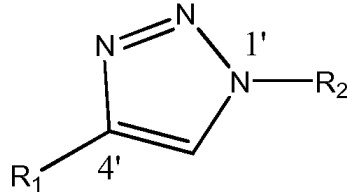
65

La reacción puede realizarse en una variedad de solventes, incluyendo mezclas acuosas, composiciones

que comprenden agua y/o mezclas acuosas, y una variedad de solventes orgánicos que incluyen composiciones que comprenden alcoholes, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), alcohol terc-butílico (TBA o tBuOH; también conocido como 2-metil-2-propanol (2M2P)) y acetona. En algunos casos, la reacción se realiza en un medio que comprende un catalizador a base de cobre como Cu/Cu(OAc)₂, una amina terciaria como tri-
 5 (benciltriazolilmetil)amina (TBTA), y/o tetrahidrofurano y acetonitrilo (THF/MeCN).

En algunos casos, el enlace de anillo de triazol tiene una estructura de acuerdo con:

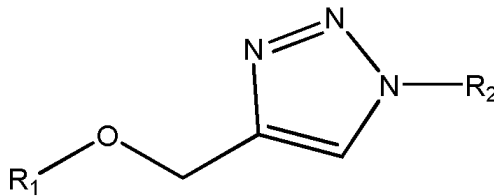
10



15

por ejemplo,

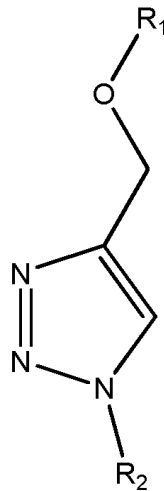
20



25

por ejemplo,

30



35

40

45

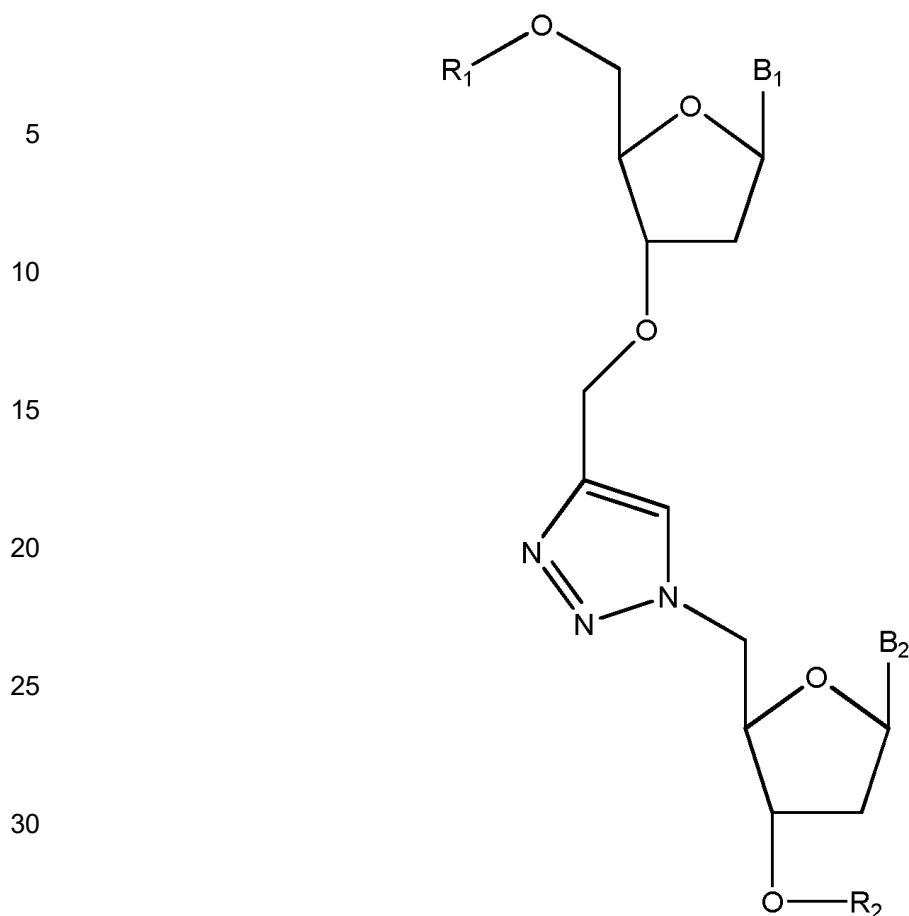
50

por ejemplo,

55

60

65



35 donde R_1 y R_2 son individualmente cualquier estructura química o fracción química (y pueden ser las mismas o diferentes estructuras químicas o fracciones químicas en diferentes estructuras) y B, B_1 y B_2 indican individualmente la base del nucleótido (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina o una nucleobase natural o sintética, por ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, etc.).

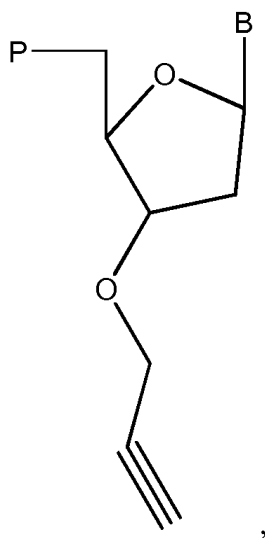
40 El enlace del anillo de triazol formado por la cicloadición de alquino-azida tiene características similares (por ejemplo, características físicas, biológicas, bioquímicas, químicas, etc.) a las de un enlace fosfodiéster natural presente en los ácidos nucleicos y, por lo tanto, es un imitador de la estructura fundamental del ácido nucleico. En consecuencia, las enzimas convencionales que reconocen los ácidos nucleicos naturales como sustratos también reconocen como sustratos los productos formados por la cicloadición de alquino-azida según se proporciona por la tecnología descrita en la presente. Ver, por ejemplo, El-Sagheer et al. (2011) "Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*", Proc Natl Acad Sci USA 108(28):11338-43.

50 En algunos casos, el uso de análogos de nucleótidos que comprenden un alquino (por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo) produce ácidos nucleicos (por ejemplo, fragmentos de polinucleótidos de ADN o ARN) que tienen un grupo terminal 3' alquino. Por ejemplo, en algunos casos, los análogos de nucleótidos que comprenden un alquino (por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo) se incorporan en una cadena en crecimiento de un ácido nucleico en una reacción de ampliación de polimerasa; una vez incorporados, los análogos de nucleótidos detienen la reacción de polimerasa. Estos ácidos nucleicos terminados son un reactivo químico apropiado para una reacción química clic (por ejemplo, cicloadición de alquino-azida), por ejemplo, para una ligadura química a una molécula modificada con azida como un ácido nucleico modificado con 5'-azida, una fracción de marcado que comprende una azida, un soporte sólido que comprende una azida, una proteína que comprende una azida, etc., incluyendo pero no limitado a, fracciones, entidades y componentes analizados en la presente. En algunos casos, por ejemplo, el grupo 3'-O-propargilo en el terminal 3' del producto de ácido nucleico se usa en una reacción de marcado con una etiqueta modificada con azida usando ligadura química, por ejemplo, como se proporciona mediante una reacción química clic. El enlace covalente creado usando esta química imita el de un enlace fosfodiéster de ácido nucleico natural, proporcionando de este modo el uso de los ácidos nucleicos ligados químicamente en reacciones enzimáticas posteriores, como una reacción en cadena de la polimerasa, con el enlace químico de triazol provocando una inhibición mínima, limitada, o indetectable (por ejemplo, ninguna) de la reacción

enzimática.

En algunos casos, el análogo de nucleótido que comprende un alquino se hace reaccionar con un reactivo que comprende una fracción fosfina en una ligadura de Staudinger. En una ligadura de Staudinger, se coloca una trampa electrofílica (por ejemplo, un éster metílico) en un grupo triarilfosfina arilo (generalmente orto al átomo de fósforo) y se hace reaccionar con la azida para producir un producto intermedio azailídico, que luego se reorganiza (por ejemplo, en medio acuoso) para producir un compuesto con grupo amida y una función de óxido de fosfina. La ligadura de Staudinger liga (une y enlaza covalentemente) las dos moléculas de partida entre sí.

Por consiguiente, en la presente se divulga tecnología relacionada con una composición que comprende un análogo de nucleótido que tiene una estructura de acuerdo con:



en donde B es una base y P comprende una fracción de fosfato. En algunas realizaciones, P comprende un tetrafosfato; un trifosfato; un difosfato; un monofosfato; un 5' hidroxilo; un alfa tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), un beta tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato) y/o un gamma tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato); o un alfa metilfosfonato, un beta metilfosfonato y/o un gamma metilfosfonato. En algunos casos, P comprende una azida (por ejemplo, N_3 , por ejemplo, $N=N=N$), proporcionando por tanto, en algunas realizaciones, un agente de polimerización direccional, bifuncional como se describe en la presente.

En algunos casos, B es una base de citosina, guanina, adenina, timina o uracilo. Es decir, en algunos casos, B es una purina o una pirimidina o una purina modificada o una pirimidina modificada. La tecnología no está limitada en las bases B que encuentran uso en los análogos de nucleótidos. Por ejemplo, B puede ser cualquier base sintética, artificial o natural; por tanto, en algunos casos, B es una base sintética; en algunos casos, B es una base artificial; en algunos casos, B es una base natural. En algunos casos, las composiciones comprenden un análogo de nucleótido y un ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido). Las composiciones en algunos casos comprenden además una polimerasa y/o un nucleótido (por ejemplo, un nucleótido convencional). En composiciones que comprenden un nucleótido y un análogo de nucleótido, en algunos casos la proporción numérica del análogo de nucleótido al nucleótido es de 1:1, 1: 2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:50, 1:75, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:5000 o 1:10000.

En algunos casos, un ácido nucleico comprende un análogo de nucleótido como se proporciona en la presente. En algunos casos, el ácido nucleico comprende el análogo de nucleótido en su extremo 3' (por ejemplo, el análogo de nucleótido está en el extremo 3' del ácido nucleico). La tecnología, en algunos casos, se refiere a la síntesis de un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido por una enzima biológica. Es decir, la enzima biológica reconoce el análogo de nucleótido como un sustrato e incorpora el análogo de nucleótido en el ácido nucleico. Por ejemplo, en algunos casos, el ácido nucleico es producido por una polimerasa.

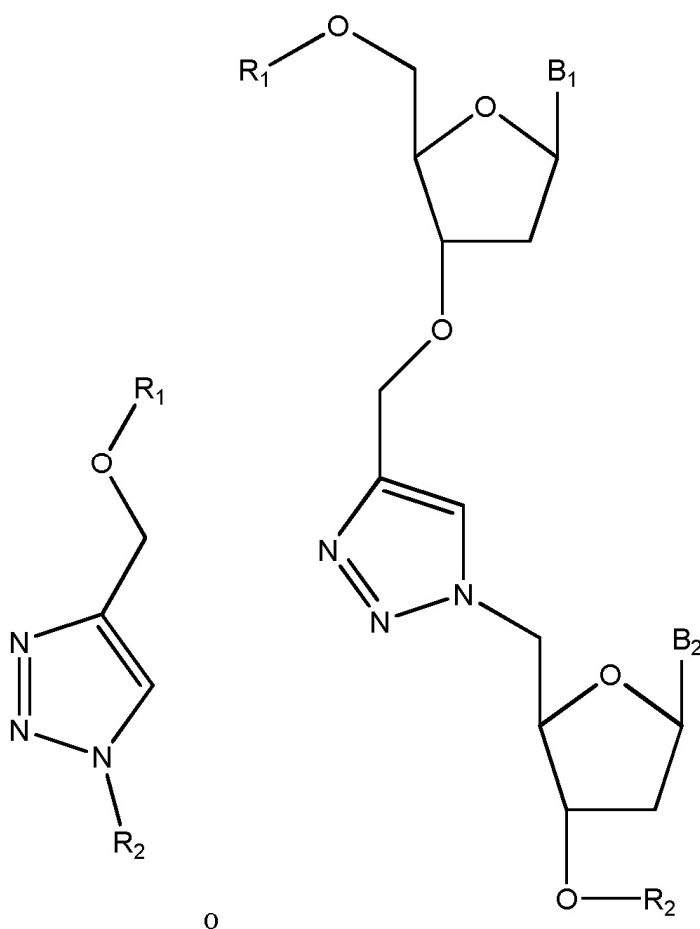
En algunos casos, las composiciones comprenden además una azida, por ejemplo, un componente, entidad, molécula, superficie, biomolécula, etc., que comprende una azida.

En algunos casos, las composiciones comprenden múltiples ácidos nucleicos, por consiguiente, en algunos casos, las composiciones comprenden un segundo ácido nucleico (por ejemplo, además de un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido). La tecnología abarca ácidos nucleicos funcionalizados para reaccionar con un

ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido. Por tanto, en algunos casos, el segundo ácido nucleico comprende una fracción de azida, por ejemplo, en algunos casos, el segundo ácido nucleico comprende una fracción de azida en el extremo 5' del segundo ácido nucleico.

5 La tecnología no está limitada en la entidad (por ejemplo, que comprende un grupo azida) que reaccionó con el ácido nucleico que comprende el análogo de nucleótido. Por ejemplo, en algunos casos, las composiciones comprenden además un marcador que comprende una azida, una etiqueta que comprende una azida, un soporte sólido que comprende una azida, un nucleótido que comprende una azida, una biotina que comprende una azida, o una proteína que comprende una azida. En algunos casos, una fracción de alquino y una fracción de azida se hacen reaccionar usando una reacción de "química clic" catalizada por un catalizador a base de cobre. Como tal, en algunos casos, las composiciones comprenden además un reactivo catalizador a base de cobre. La reacción de la azida y el alquino produce, en algunos casos, una fracción de triazol. En algunos casos, un ácido nucleico que comprende un alquino (por ejemplo, un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido que comprende un alquino) se hace reaccionar con un ácido nucleico que comprende una azida para producir un ácido nucleico más largo. Como tal, en algunos casos, las composiciones de acuerdo con la tecnología comprenden además un ácido nucleico que comprende un triazol (por ejemplo, que forma un enlace entre los dos ácidos nucleicos). En algunos casos, la reacción del alquino y la azida continúa con la regioselectividad, por ejemplo, en algunos casos, el ácido nucleico comprende un triazol 1', 4' sustituido. En algunos casos, el ácido nucleico que comprende el análogo de nucleótido se hace reaccionar con un oligonucleótido adaptador, un oligonucleótido adaptador que comprende un código de barras, o un oligonucleótido de código de barras que comprende una azida. Por tanto, en algunos casos se proporcionan mezclas de la reacción que comprenden un oligonucleótido adaptador, un oligonucleótido adaptador que comprende un código de barras o un oligonucleótido de código de barras.

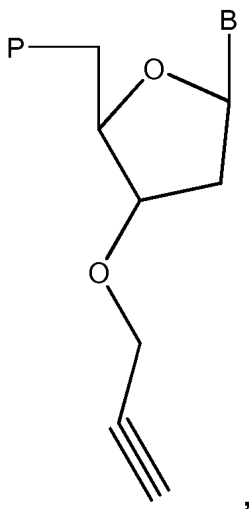
En algunos casos, un ácido nucleico (por ejemplo, formado a partir de la unión de dos ácidos nucleicos por reacción de "química clic" de un alquino y una azida) comprende una estructura de acuerdo con:



donde R_1 y R_2 son individualmente cualquier estructura química o fracción química (y pueden ser las mismas o diferentes estructuras químicas o fracciones químicas en diferentes estructuras) y B_1 y B_2 indican individualmente la base del nucleótido (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina, o una nucleobase natural o sintética, por

ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, etc.).

Otro aspecto de la tecnología se refiere a casos de métodos para sintetizar un ácido nucleico modificado, el método comprendiendo proporcionar un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquino y enlazar un ácido nucleico al análogo de nucleótido para producir un ácido nucleico modificado que comprende el análogo de nucleótido. En algunos casos, el análogo de nucleótido tiene una estructura de acuerdo con:



en donde B es una base (por ejemplo, citosina, guanina, adenina, timina o uracilo) y P comprende una fracción de trifosfato. Los casos del método comprenden además proporcionar, por ejemplo, una plantilla, un cebador, un nucleótido (por ejemplo, un nucleótido convencional), y/o una polimerasa. Los análogos de nucleótidos son reconocidos como un sustrato por enzimas biológicas como las polimerasas; por tanto, en algunos casos, una polimerasa cataliza el enlace de un ácido nucleico al análogo de nucleótido para producir un ácido nucleico modificado que comprende el análogo de nucleótido. El ácido nucleico modificado proporciona un sustrato para la reacción con una entidad portadora de azida, por ejemplo, para formar un producto conjugado mediante una reacción de "química clic". Por tanto, en algunos casos, los métodos comprenden además hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con una fracción de azida. Los métodos no están limitados en la entidad que comprende la fracción de azida; por ejemplo, en algunos casos, los métodos comprenden hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con un segundo ácido nucleico que comprende una fracción de azida, por ejemplo, hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con un segundo ácido nucleico que comprende una fracción de azida en el extremo 5' del segundo ácido nucleico, un marcador que comprende una azida, una etiqueta que comprende una azida, un soporte sólido que comprende una azida, un nucleótido que comprende una azida y/o una proteína que comprende una azida.

Los métodos se usan para enlazar un oligonucleótido adaptador (por ejemplo, para su uso en secuenciación de próxima generación) con un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido. Por consiguiente, en algunos casos, los métodos comprenden además hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con un oligonucleótido adaptador que comprende una fracción de azida, un oligonucleótido adaptador que comprende un código de barras y que comprende una fracción de azida, y/o un oligonucleótido de código de barras que comprende una fracción de azida, por ejemplo, para producir un conjugado de ácido nucleico-oligonucleótido. En algunos casos, las reacciones de un análogo de nucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido) y una azida se catalizan mediante un reactivo catalizador a base de cobre. Los métodos asociados, de acuerdo con algunos casos comprenden hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con una fracción de azida y un reactivo catalizador a base de cobre. Como el anillo de triazol formado por la reacción de "química clic" no inhibe sustancial y/o detectablemente la actividad enzimática biológica, el conjugado de ácido nucleico-oligonucleótido proporciona un ácido nucleico útil para una manipulación adicional, por ejemplo, en algunos casos, el ácido nucleico modificado es un sustrato para una enzima biológica, el ácido nucleico modificado es un sustrato para una polimerasa, y/o el ácido nucleico modificado es un sustrato para una reacción de secuenciación.

Los análogos de nucleótidos divulgados en la presente son terminadores funcionales, por ejemplo, actúan para terminar la síntesis de un ácido nucleico (por ejemplo, similar a un didesoxinucleótido como se usa en la secuenciación de Sanger) a la vez que también comprenden un grupo reactivo para el procesamiento químico adicional. Por consiguiente, como se describe en la presente, en algunos casos, los métodos comprenden además terminar la polimerización con el análogo de nucleótido.

Los métodos relacionados proporcionan, en algunas realizaciones, un método para secuenciar un ácido nucleico, el método comprendiendo hibridar un cebador con una plantilla de ácido nucleico para formar un complejo

de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado; proporcionando una pluralidad de análogos de nucleótidos, cada análogo de nucleótido comprendiendo una fracción de alquino; hacer reaccionar el complejo de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado y el análogo de nucleótido con una polimerasa para añadir el análogo de nucleótido al cebador mediante una reacción de polimerasa para formar un producto ampliado que comprende un análogo de nucleótido incorporado; y hacer reaccionar el producto ampliado con un compuesto que contiene azida para formar una estructura que comprende un anillo de triazol. Los análogos de nucleótidos son análogos de nucleótidos 3'OO-propargil-dNTP y N se selecciona del grupo que consiste de A, C, G, T y U. Como el anillo de triazol formado por la reacción de "química clic" no inhibe sustancial y/o detectablemente la actividad enzimática biológica, el conjugado de ácido nucleico-oligonucleótido proporciona un ácido nucleico útil para una manipulación adicional. Por tanto, en algunas realizaciones, la estructura que comprende un anillo de triazol se usa en reacciones enzimáticas posteriores, por ejemplo, una reacción de cadena de polimerasa y/o una reacción de secuenciación. La polimerización en presencia de análogos de nucleótidos se realiza, en algunas realizaciones, en presencia también de nucleótidos convencionales (por ejemplo, no terminadores). Los métodos relacionados comprenden proporcionar nucleótidos convencionales.

También se divulgan en la presente kits. Por ejemplo, en algunos casos, se proporcionan kits para sintetizar un ácido nucleico modificado, el kit comprendiendo un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquino; y un reactivo catalizador a base de cobre. En algunos casos, los kits comprenden además otros componentes que tienen uso en el procesamiento y/o manipulación de ácidos nucleicos. Por tanto, en algunos casos, los kits comprenden además una polimerasa, un oligonucleótido adaptador que comprende una fracción de azida, y/o un nucleótido (por ejemplo, un nucleótido convencional).

Por ejemplo, algunos casos de la tecnología se refieren a kits para producir una biblioteca de secuenciación NGS y/o para obtener información de secuencia de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, en la presente se divulga un kit que comprende un análogo de nucleótido, por ejemplo, para producir una escalera de fragmentos de nucleótidos de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente. En algunos casos, el análogo de nucleótido es un análogo de nucleótido 3'-O bloqueado, por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-alquino, por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo. En algunos casos, los nucleótidos A, C, G, U y/o T convencionales se proporcionan en un kit, así como uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) análogos de nucleótidos A, C, G, U y/o T.

En algunos casos, los kits comprenden una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa natural, una polimerasa modificada y/o una polimerasa diseñada, etc.), por ejemplo, para amplificación (por ejemplo, por ciclado térmico, amplificación isotérmica) o para secuenciación, etc. En algunos casos, los kits comprenden una ligasa, por ejemplo, para unir adaptadores a un ácido nucleico tal como un amplicón o un fragmento de escalera o para hacer circularizar un amplicón adaptador. Algunos casos de kits comprenden un reactivo catalizador a base de cobre, por ejemplo, para una reacción química clic, por ejemplo, para hacer reaccionar una azida y un grupo alquino para formar un enlace de triazol. En algunos casos, los kits proporcionan tampones, sales, recipientes de reacción, instrucciones y/o software de computadora.

En algunos casos, los kits comprenden cebadores y/o adaptadores. En algunos casos, los adaptadores comprenden una modificación química adecuada para unir el adaptador al análogo de nucleótido, por ejemplo, mediante clic química. Por ejemplo, en algunos casos, el kit comprende un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquino y un oligonucleótido adaptador que comprende un grupo azida (N_3). En algunos casos, se usa un proceso de "química clic" como una cicloadición de azida-alquino para enlazar el adaptador al fragmento mediante la formación de un triazol.

En particular, en la presente se divulga un kit para generar una biblioteca de secuenciación, el kit comprendiendo un oligonucleótido adaptador que comprende un primer grupo reactivo (por ejemplo, una azida), un análogo de nucleótido 3'-O-bloqueado (por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-alquino o un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo, por ejemplo, que comprende un grupo alquino, por ejemplo, que comprende un segundo grupo reactivo que forma un enlace químico con el primer grupo reactivo, por ejemplo, usando química clic), una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa para amplificación isotérmica o ciclado térmico), un segundo oligonucleótido adaptador, una o más composiciones que comprenden un nucleótido o una mezcla de nucleótidos, y una ligasa o un reactivo catalizador de química clic a base de cobre.

En la presente se divulgan kits que comprenden uno o más análogos de nucleótidos 3'-O-bloqueados (por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-laquino tal como uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo y uno o más oligonucleótidos adaptadores que comprenden un grupo azida (por ejemplo, un oligonucleótido de 5'-azido, por ejemplo, un oligonucleótido de 5'-azido-metilo). Algunos kits proporcionan además un oligonucleótido de 5'-azido-metilo que comprende un código de barras. Algunos kits proporcionan además una pluralidad de oligonucleótidos de 5'-azido-metilo que comprenden una pluralidad de códigos de barras (por ejemplo, cada oligonucleótido de 5'-azido-metilo comprende un código de barras que puede distinguirse de uno o más de otros códigos de barras de otros oligonucleótidos de 5'-azido-metilo que comprenden un código de barras diferente). Kits adicionales comprenden un reactivo catalítico de química clic (por ejemplo, un reactivo catalítico de cobre (I)).

En la presente se divulgan kits que comprenden uno o más dNTP estándar además del uno o más uno o más análogos de nucleótidos 3'-O-bloqueados (por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-alquínilo s como uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo. Por ejemplo, algunos kits proporcionan dATP, dCTP, dGTP y dTTP, ya sea en recipientes separados o como una mezcla con uno o más 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y/o 3'-O-propargil-dATP.

En algunos casos, un kit comprende además una polimerasa obtenida, derivada, aislada, clonada, etc. de una especie *Thermococcus* (por ejemplo, un organismo del linaje taxonómico Archaeai Euryarchaeotai Thermococci; Thermococcales; Thermococcaceae; *Thermococcus*). En algunos casos, la polimerasa se obtiene de, deriva de, aísla de, clona de, etc. de una especie *Thermococcus* 9° N-7. En algunos casos, la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de sustratos modificados como didesoxinucleótidos, ribonucleótidos y aciclonucleótidos modificados. En algunos casos, la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de análogos de nucleótidos que comprenden grupos funcionales 3' modificados como los dNTP de 3'OO-propargilo descritos en la presente. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la polimerasa comprende una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de polimerasa de tipo salvaje *Thermococcus* sp. 9°N-7, por ejemplo, una sustitución de alanina por el ácido aspártico en la posición de aminoácidos 141 (D141A), una sustitución de alanina por el ácido glutámico en la posición de aminoácidos 143 (E143A), una sustitución de valina por la tirosina en la posición de aminoácidos 409 (Y409V), y/o una sustitución de leucina por la alanina en la posición de aminoácidos 485 (A485L). En algunos casos, la polimerasa se proporciona en un organismo huésped heterólogo como *Escherichia coli* que comprende un gen de polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7, por ejemplo, que comprende una o más mutaciones (por ejemplo, D141A, E143A, Y409V y/o A485L). En algunos casos, la polimerasa es una polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 vendida bajo el nombre comercial THERMINATOR (por ejemplo, THERMINATOR II) por New England BioLabs (Ipswich, Mass.).

Por consiguiente, en la presente se divulgan kits que comprenden uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo (por ejemplo, uno o más de 3'-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y/o 3'-O-propargil-dATP), una mezcla de dNTP estándar (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP), uno o más adaptadores de oligonucleótido de 5'-azido-metilo, una polimerasa obtenida de, derivada de, aislada de, clonada de, etc., una especie *Thermococcus*, y un catalizador químico clic para formar un triazol a partir de un grupo azida y un grupo alquilo. En algunos casos, el uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo (por ejemplo, uno o más de 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y/o 3'-O-propargil-dATP) y la mezcla de dNTP estándar (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) se proporcionan juntos, por ejemplo, el kit comprende una solución que comprende el uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo (por ejemplo, uno o más de 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y/o 3'-O-propargil-dATP) y la mezcla de dNTP estándar (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). En algunos casos, la solución comprende el uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo (por ejemplo, uno o más de 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y/o 3'-O-propargil-dATP) y la mezcla de dNTP estándar (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una proporción de 1:500 a 500:1 (por ejemplo, 1:500, 1:450, 1:400, 1:350, 1:300, 1:250, 1:200, 1:150, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 350:1, 400:1, 450:1 o 500:1).

También se divulgan en la presente kits que comprenden además software para procesar datos de secuencia, por ejemplo, para extraer datos de secuencias de nucleótidos a partir de los datos producidos por un secuenciador; para identificar códigos de barras y subsecuencias objetivo a partir de los datos producidos por un secuenciador; para alinear y/o ensamblar subsecuencias a partir de los datos producidos por un secuenciador para producir una secuencia de consenso; y/o para alinear subsecuencias y/o una secuencia de consenso con una secuencia de referencia.

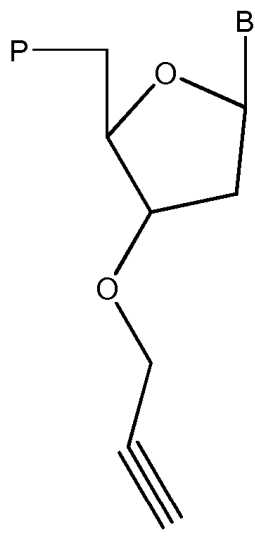
En la presente se divulgan composiciones que comprenden un análogo de nucleótido que tiene una estructura de acuerdo con:

5

10

15

20



25

30

en donde B es una base (por ejemplo, una purina o una pirimidina como una citosina, guanina, adenina, timina o uracilo; por ejemplo, una purina modificada o una pirimidina modificada) y P comprende una fracción de fosfato (por ejemplo, un tetrafosfato; un trifosfato; un difosfato; un monofosfato; un 5' hidroxilo; un alfa tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), un beta tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), y/o un gamma tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato); o un alfa metilfosfonato, un beta metilfosfonato y/o un gamma metilfosfonato); un ácido nucleico; una polimerasa; y un nucleótido (por ejemplo, que comprende la base B, por ejemplo, en una proporción numérica del análogo de nucleótido al nucleótido que es de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:50, 1:75, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:5000 o 1:10000).

35

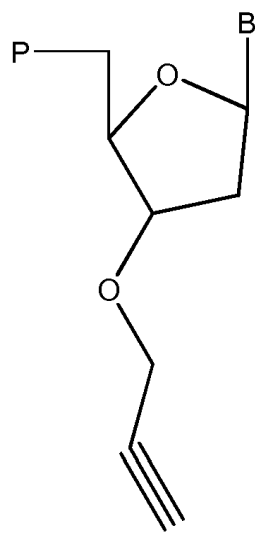
También se divulgan composiciones que comprenden un ácido nucleico (por ejemplo, producido por una polimerasa), en donde el ácido nucleico comprende un análogo de nucleótido (por ejemplo, en su extremo 3') que tiene una estructura de acuerdo con:

40

45

50

55



60

65

en donde B es una base (por ejemplo, una purina o una pirimidina como una citosina, guanina, adenina, timina o uracilo; por ejemplo, una purina modificada o una pirimidina modificada) y P comprende una fracción de fosfato (por ejemplo, un tetrafosfato; un trifosfato; un difosfato; un monofosfato; un 5' hidroxilo; un alfa tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), un beta tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), y/o un gamma tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato); o un alfa metilfosfonato, un beta metilfosfonato y/o un gamma metilfosfonato); un segundo ácido nucleico (por ejemplo, que comprende una azida, por ejemplo, en su extremo 5'),

un marcador que comprende una azida, una etiqueta que comprende una azida, un soporte sólido que comprende una azida, un nucleótido que comprende una azida, una biotina que comprende una azida, o una proteína que comprende una azida; un reactivo catalítico de cobre (por ejemplo, a base de cobre); un ácido nucleico que comprende un triazol (por ejemplo, un triazol 1', 4' sustituido); y/o una estructura como:

5

10

15

20

25

30

35

40

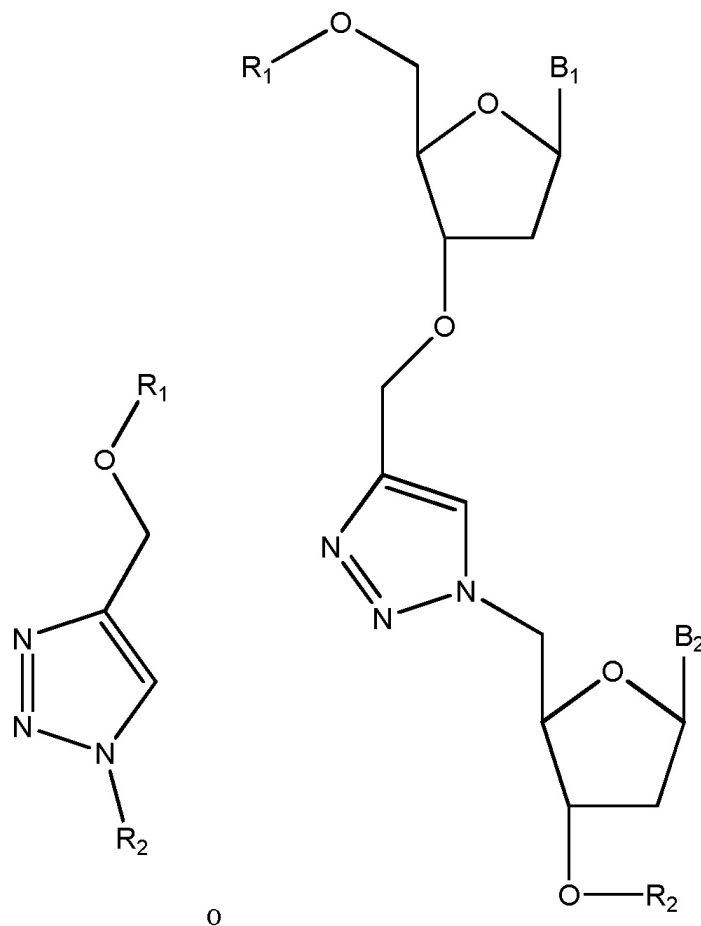
45

50

55

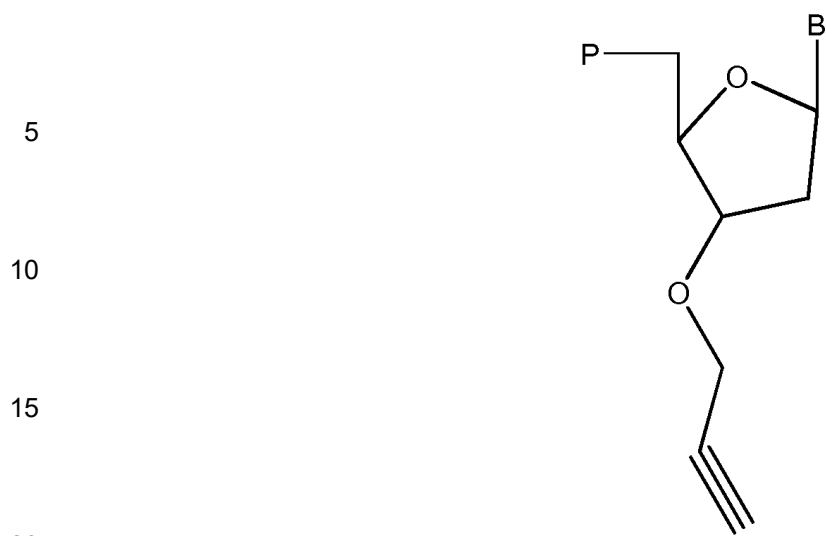
60

65



donde R₁ y R₂ son individualmente cualquier estructura química o fracción química (y pueden ser las mismas o diferentes estructuras químicas o fracciones químicas en diferentes estructuras) y B₁ y B₂ individualmente indican la base del nucleótido (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina, o una nucleobase natural o sintética, por ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, etc.); un oligonucleótido adaptador, un oligonucleótido adaptador que comprende un código de barras, o un oligonucleótido de código de barras.

En otro aspecto, la tecnología divulgada proporciona un método para sintetizar un ácido nucleico modificado, el método comprendiendo proporcionar un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquino, por ejemplo, un nucleótido que tiene una estructura de acuerdo con:



en donde B es una base (por ejemplo, citosina, guanina, adenina, timina o uracilo) y P comprende una fracción de trifosfato; enlazar un ácido nucleico al análogo de nucleótido para producir un ácido nucleico modificado que comprende el análogo de nucleótido; proporcionar una plantilla; proporcionar un cebador; proporcionar un nucleótido; proporcionar una polimerasa (por ejemplo, para catalizar el enlace del ácido nucleico al análogo de nucleótido); terminar la polimerización con el análogo de nucleótido; hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con una fracción de azida (por ejemplo, con un segundo ácido nucleico que comprende una fracción de azida en su extremo 5', un marcador que comprende una azida, una etiqueta que comprende una azida, un soporte sólido que comprende una azida, un nucleótido que comprende una azida, una proteína que comprende una azida, un oligonucleótido adaptador que comprende una fracción de azida, un oligonucleótido adaptador que comprende un código de barras y que comprende una fracción de azida, o un oligonucleótido de código de barras que comprende una fracción de azida), por ejemplo, para producir un conjugado de ácido nucleico-oligonucleótido (por ejemplo, que es un sustrato para una enzima biológica como una polimerasa y/o para proporcionar un sustrato para una reacción de secuenciación); y/o hacer reaccionar el ácido nucleico modificado con una fracción de azida y un reactivo catalizador a base de cobre.

En algunas realizaciones se proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico, el método comprendiendo hibridar un cebador con una plantilla de ácido nucleico para formar un complejo de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado; proporcionando una pluralidad de análogos de nucleótidos de 3'-O-propargil-dNTP como se enumera en la reivindicación 12; hacer reaccionar el complejo de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado y el análogo de nucleótido con una polimerasa para añadir el análogo de nucleótido al cebador mediante una reacción de polimerasa para formar un producto ampliado que comprende un análogo de nucleótido incorporado; y hacer reaccionar el producto ampliado con un compuesto que contiene azida para formar una estructura que comprende un anillo de triazol (por ejemplo, que se usa en las reacciones enzimáticas posteriores como una reacción de cadena de la polimerasa).

En la presente se divulga un kit para sintetizar un ácido nucleico modificado, el kit comprendiendo un análogo de nucleótido que comprende un grupo alquínico; un reactivo catalizador a base de cobre; una polimerasa; un oligonucleótido adaptador que comprende una fracción de azida; y un nucleótido convencional.

Los casos particulares se refieren a la generación de una escalera de fragmentos de ácidos nucleicos usando una reacción de polimerasa que comprende dNTP estándar y 3'-O-propargil-dNTP a una relación molar de 1:500 a 500:1 (dNTP estándar a 3'-O-propargil-dNTP). Los fragmentos de ácidos nucleicos terminados producidos por los métodos descritos en la presente comprenden un grupo propargilo en sus extremos 3'. Casos adicionales se refieren a la unión de un adaptador a los extremos 3' de los fragmentos de ácidos nucleicos usando conjugación química. Por ejemplo, en algunos casos, un oligonucleótido modificado con 5'-azido (por ejemplo, un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo) se conjuga con los fragmentos de ácido nucleico terminado con 3'-propargil mediante química clic (por ejemplo, en una reacción catalizada por un reactivo de cobre (por ejemplo, cobre (I)). En algunos casos, se amplifica primero una región objetivo (por ejemplo, por PCR) para producir un amplicón objetivo para la secuenciación. En algunos casos, la amplificación de la región objetivo comprende la amplificación de la región objetivo durante 5 a 15 ciclos (por ejemplo, una amplificación de "ciclo limitado" o "ciclo bajo").

Casos adicionales proporcionan que el amplicón objetivo comprenda una etiqueta (por ejemplo, comprende una secuencia de código de barras), por ejemplo, el amplicón objetivo es un amplicón identificable. En algunos casos, un cebador usado en la amplificación de la región objetivo comprende una etiqueta (por ejemplo, que comprende una secuencia de código de barras) que se incorpora posteriormente en el amplicón objetivo (por

ejemplo, en una reacción de "copiar y etiquetar") para producir un amplicón identificable. En algunos casos, un adaptador que comprende la etiqueta (por ejemplo, que comprende una secuencia de código de barras) se liga al amplicón objetivo después de la amplificación (por ejemplo, en una reacción de ligasa) para producir un adaptador-amplicón identificable. En algunos casos, el cebador usado para producir un amplicón identificable en una reacción de copia y etiqueta comprende una región 3' que comprende una secuencia de cebado específica del objetivo y una región 5' que comprende dos secuencias universales diferentes (por ejemplo, una secuencia universal A y una secuencia universal B) que flanquean una secuencia degenerada. En algunos casos, un adaptador ligado a un amplicón para producir un adaptador-amplicón identificable es un adaptador de cadena doble, por ejemplo, que comprende una cadena que comprende una secuencia degenerada (por ejemplo, que comprende de 8 a 12 bases) flanqueada tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' por dos secuencias universales diferentes (por ejemplo, una secuencia universal A y una secuencia universal B) y una segunda cadena que comprende una secuencia universal C (por ejemplo, en el extremo 5') y una secuencia (por ejemplo, en el extremo 3') que es complementaria a la secuencia universal B y que tiene una T adicional en la posición 3'-terminal.

Los casos de la tecnología proporcionan la generación de fragmentos de escalera de ácidos nucleicos a partir de un amplicón adaptador, por ejemplo, para proporcionar una biblioteca de secuenciación para NGS. En particular, la tecnología proporciona la generación de una escalera de ácidos nucleicos terminada en 3'-O-propargil-dN para la secuenciación de ácido nucleico (por ejemplo, NGS), por ejemplo, usando una reacción de polimerasa que comprende dNTP estándar y 3'-O-propargil-dNTP a una proporción molar de 1:500 a 500:1 (dNTP estándar a 3'-propargil-dNTP). Entonces, en algunos casos, la tecnología proporciona unir un adaptador a los extremos 3' de los fragmentos de ácido nucleico usando conjugación química. Por ejemplo, en algunos casos, un oligonucleótido modificado con 5'-azido (por ejemplo, un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo) se conjuga con los fragmentos de ácido nucleico terminados con 3'-propargilo mediante química clic (por ejemplo, en una reacción catalizada por cobre (por ejemplo, reactivo de cobre (I))).

Algunas realizaciones de la tecnología proporcionan una biblioteca de secuenciación de próxima generación para obtener una secuencia de un ácido nucleico objetivo, la composición comprendiendo n ácidos nucleicos (por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de ácidos nucleicos), en donde cada uno de los n ácidos nucleicos comprende un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo como se enumera en la reivindicación 6. En algunas realizaciones, cada ácido nucleico de los n ácidos nucleicos comprende una subsecuencia de nucleótidos de una secuencia de nucleótidos objetivo. En particular, las realizaciones proporcionan una composición que comprende n ácidos nucleicos, en donde cada uno de los n ácidos nucleicos está terminado por un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo como se enumera en la reivindicación 6. Realizaciones adicionales proporcionan una composición que comprende n ácidos nucleicos (por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de ácidos nucleicos), en donde cada uno de los n ácidos nucleicos comprende un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo como se enumera en la reivindicación 6 y cada uno de los n ácidos nucleicos se conjuga (por ejemplo, se enlaza) a un adaptador de oligonucleótidos mediante un enlace de triazol (por ejemplo, un enlace formado a partir de una conjugación química de un grupo propargilo y un grupo azido, por ejemplo, por una reacción química clic). Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan una composición que comprende n ácidos nucleicos (por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de ácidos nucleicos), en donde cada uno de los n ácidos nucleicos comprende un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo (por ejemplo, un 3'-O-propargil-dA, 3'-O-propargil-dC, 3'-O-propargil-dG, y/o 3'-O-propargil-dT) como se enumera en la reivindicación 6, conjugado (por ejemplo, enlazado) a un adaptador de oligonucleótido mediante un enlace de triazol (por ejemplo, un enlace formado a partir de una conjugación química de un grupo propargilo y un grupo azido, por ejemplo, mediante una reacción de química clic).

En algunos casos, la biblioteca de secuenciación de próxima generación para obtener una secuencia de un ácido nucleico objetivo se produce mediante un método que comprende sintetizar n ácidos nucleicos (por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de ácidos nucleicos) usando una mezcla de dNTP y uno o más análogos de nucleótidos 3'-O-propargilo (por a una proporción molar de 1:500 a 500:1 (por ejemplo, 1:500, 1:450, 1:400, 1:350, 1:300, 1:250, 1:200, 1:150, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 350:1, 400:1, 450:1, o 500:1). En algunos casos, la biblioteca de próxima generación se produce usando una polimerasa obtenida de, derivada de, aislada de, clonada de, etc. de una especie *Thermococcus* (por ejemplo, un organismo del linaje taxonómico Archaea; Euryarchaeota; Thermococci; Thermococcales; Thermococcaceae; *Thermococcus*). En algunos casos, la polimerasa se obtiene de, deriva de, aísla de, clona de, etc. de una especie *Thermococcus* 9^oN-7. En algunos casos, la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de sustratos modificados como didesoxinucleótidos, ribonucleótidos y aciconucleótidos modificados. En algunos casos, la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de análogos de nucleótidos que comprenden grupos funcionales 3' modificados como los dNTP de 3'-O-propargilo descritos en la presente. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la polimerasa comprende una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de polimerasa de tipo salvaje de *Thermococcus* sp. 9^oN-7, por ejemplo, una sustitución de alanina por el ácido aspártico en la posición de aminoácidos 141 (D141A), una sustitución de alanina por el ácido glutámico en la posición de aminoácidos 143 (E143A), una sustitución de valina por la tirosina en la posición de aminoácidos 409 (Y409V), y/o una sustitución de leucina por la alanina en la posición de aminoácidos 485 (A485L). En algunos casos,

la polimerasa se proporciona en un organismo huésped heterólogo como *Escherichia coli* que comprende un gen de polimerasa de *Thermococcus sp.* 9^oN-7 clonado, por ejemplo, que comprende una o más mutaciones (por ejemplo, D141A, E143A, Y409V y/o A485L). En algunos casos, la polimerasa es una polimerasa de *Thermococcus sp.* 9^oN-7 vendida bajo el nombre comercial THERMINATOR (por ejemplo, THERMINATOR II) por New England BioLabs (Ipswich, Mass.).

Por consiguiente la tecnología se refiere a mezclas de reacción que comprenden un ácido nucleico objetivo, una mezcla de dNTP y análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo como se enumera en la reivindicación 1, por ejemplo a una proporción molar de 1:500 a 500:1 (por ejemplo, 1:500, 1:450, 1:400, 1:350, 1:300, 1:250, 1:200, 1:150, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 350:1, 400:1, 450:1, o 500:1), y una polimerasa para sintetizar un ácido nucleico usando los dNTP y uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo (por ejemplo, una polimerasa obtenida de, derivada de, aislada de, clonada de, etc., una especie *Thermococcus*). En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo es un amplicón. En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo comprende un código de barras. En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo es un amplicón que comprende un código de barras. En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo es un amplicón ligado a un adaptador que comprende un código de barras. Algunas realizaciones proporcionan mezclas de reacción que comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo, cada ácido nucleico objetivo comprendiendo un código de barras asociado con una característica identificable del ácido nucleico objetivo.

Algunos casos proporcionan una composición de mezcla de reacción que comprende una plantilla (por ejemplo, una plantilla circular, por ejemplo, que comprende una secuencia de nucleótidos universal y/o una secuencia de nucleótidos con código de barras) que comprende una subsecuencia de un ácido nucleico objetivo, una polimerasa, uno o más fragmentos de un biblioteca de fragmentos de escalera y un análogo de nucleótido 3'-O-bloqueado.

Algunos casos proporcionan una composición de mezcla de reacción que comprende una biblioteca de ácidos nucleicos, la biblioteca de ácidos nucleicos comprendiendo secuencias de nucleótidos cortas superpuestas en mosaico sobre un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, las secuencias de nucleótidos cortas superpuestas cubren una región del ácido nucleico objetivo que comprende 100 bases, 200 bases, 300 bases, 400 bases, 500 bases, 600 bases, 700 bases, 800 bases, 900 bases, 1000 bases, o más de 1000 bases, por ejemplo, 2000 bases, 2500 bases, 3000 bases, 3500 bases, 4000 bases, 4500 bases, 5000 bases o más de 5000 bases) y desplazadas entre sí por 1-20, 1-10 o 1-5 bases (por ejemplo, 1 base) y cada ácido nucleico de la biblioteca comprendiendo menos de 100 bases, menos de 90 bases, menos de 80 bases, menos de 70 bases, menos de 60 bases, menos de 50 bases, menos de 45 bases, menos de 40 bases, menos de 35 bases, o menos de 30 bases.

A continuación se proporcionan realizaciones adicionales y como variaciones de la tecnología descrita tal como la entenderá un experto en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente tecnología se entenderán mejor con respecto a los siguientes dibujos:

La Figura 1 es un esquema que muestra una reacción de ampliación de polimerasa usando 3'-O-propargil-dGTP. La ampliación de polimerasa se detiene después de la incorporación de 3'-O-propargil-dGTP, produciendo el producto 1. Un fragmento de ADN modificado con 5'-azida se liga químicamente al producto 1 usando química clic produciendo el producto 2. El enlace covalente creado por la formación del anillo de triazol imita el del enlace de fosfodiéster de la estructura fundamental de ADN natural. El producto 2 se usa posteriormente en reacciones enzimáticas (por ejemplo, PCR).

La Figura 2 es un esquema que muestra una reacción de ampliación de polimerasa usando una combinación de dNTP y 3'-O-propargil-dNTP. Los fragmentos de escalera de ADN (n+1 fragmentos) se generan con cada uno de los extremos 3' de los fragmentos que tienen un grupo alquino. Estos fragmentos de escalera de ADN están ligados a una molécula de ADN modificada con 5'-azida, que tiene una secuencia "universal" y/o una secuencia de código de barras y/o un sitio de unión de cebador, mediante química clic. Los fragmentos de ADN ligados se tratan posteriormente y se usan como entrada en los procesos de secuenciación de próxima generación (NGS). Estos fragmentos de ADN con la característica n+1 producen datos de secuenciación de ADN mediante el ensamblaje de lecturas cortas, disminuyendo de este modo significativamente el tiempo de ejecución de NGS.

La Figura 3 muestra datos analíticos para 3'-O-propargil-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato (3'-propargil-dCTP) sintetizado como se describe en la presente. La Figura 3A muestra los datos de ¹NMR para 3'-O-propargil-dCTP. La Figura 3B muestra una porción ampliada de los datos de ¹NMR para 3'-O-propargil-dCTP que se muestran en la Figura 3A. La Figura 3C muestra una porción ampliada de los datos de ¹NMR para 3'-O-propargil-dCTP que se muestran en la Figura 3A. La figura 3D muestra datos de ³¹P NMR para 3'-O-propargil-dCTP. La Figura 3E muestra una porción ampliada de los datos de ³¹P NMR para 3'-O-propargil-dCTP que se

muestran en la Figura 3D. La Figura 3F muestra datos de HPLC de intercambio aniónico para 3'-O-propargil-dCTP. La Figura 3G muestra datos de espectro de masas de alta resolución para 3'-O-propargil-dCTP.

La Figura 4 muestra datos analíticos para 3'-O-propargil-2'-desoxitimidina-5'-trifosfato (3'-O-propargil-dTTP) sintetizado como se describe en la presente. La Figura 4A muestra los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dTTP. La Figura 4B muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dTTP que se muestran en la Figura 4A. La Figura 4C muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dTTP que se muestran en la Figura 4A. La Figura 4D muestra datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dTTP. La Figura 4E muestra una porción ampliada de los datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dTTP que se muestran en la Figura 4D. La Figura 4F muestra datos de HPLC de intercambio aniónico para 3'-O-propargil-dTTP. La Figura 4G muestra datos de espectro de masas de alta resolución para 3'-O-propargil-dTTP.

La Figura 5 muestra datos analíticos para 3'-O-propargil-2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato (3'-O-propargil-dATP) sintetizado como se describe en la presente. La Figura 5A muestra los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dATP. La Figura 5B muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dATP que se muestran en la Figura 5A. La Figura 5C muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dATP que se muestran en la Figura 5A. La Figura 5D muestra datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dATP. La Figura 5E muestra una porción ampliada de los datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dATP que se muestran en la Figura 5D. La Figura 5F muestra datos de HPLC de intercambio aniónico para 3'-O-propargil-dATP. La Figura 5G muestra datos de espectro de masas de alta resolución para 3'-O-propargil-dATP.

La Figura 6 muestra datos analíticos para 3'-O-propargil-2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato (3'-O-propargil-dGTP) sintetizado como se describe en la presente. La Figura 6A muestra los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dGTP. La Figura 6B muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dGTP que se muestran en la Figura 6A. La Figura 6C muestra una porción ampliada de los datos de ^1H NMR para 3'-O-propargil-dGTP que se muestran en la Figura 6A. La Figura 6D muestra datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dGTP. La Figura 6E muestra una porción ampliada de los datos de ^{31}P NMR para 3'-O-propargil-dGTP que se muestran en la Figura 6D. La Figura 6F muestra datos de HPLC de intercambio aniónico para 3'-O-propargil-dGTP. La Figura 6G muestra datos de espectro de masas de alta resolución para 3'-O-propargil-dGTP.

Debe entenderse que las figuras no están necesariamente dibujadas a escala, ni los objetos en las figuras están necesariamente dibujados a escala unos con respecto a otros. Las figuras son representaciones que se pretende que aporten claridad y comprensión a varias realizaciones de aparatos, sistemas y métodos divulgados en la presente. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a las mismas partes o unas similares. Además, debe apreciarse que no se pretende que los dibujos limiten el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se divulga tecnología relacionada con la manipulación y detección de ácidos nucleicos, incluyendo, pero no limitado a composiciones, métodos, sistemas y kits relacionados con nucleótidos que comprenden una fracción de enlace químicamente reactivo. En particular, la tecnología divulgada proporciona análogos de nucleótidos que comprenden una base (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina o uracilo), un azúcar (por ejemplo, una ribosa o desoxirribosa) y una fracción química de alquino, por ejemplo, unidos al oxígeno 3' del azúcar (por ejemplo, el oxígeno 3' de la desoxirribosa o el oxígeno 3' de la ribosa). Los análogos de nucleótidos (por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-alquino, por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo como un 3'-O-propargilo dNTP o un 3'-O-propargilo NTP) encuentran uso en la tecnología divulgada para introducir una fracción química particular (por ejemplo, un alquino) en el extremo (por ejemplo, el extremo 3') de un ácido nucleico (por ejemplo ADN o ARN) mediante reacción de ampliación de polimerasa y, en consecuencia, para producir una modificación de ácido nucleico que no existe en los sistemas biológicos naturales. El ligamiento químico entre los productos de ampliación de polimerasa y los compañeros de conjugación apropiados (por ejemplo, entidades modificadas con azida) se logra con alta eficiencia y especificidad usando química clic. Los terminadores de nucleótidos funcionales divulgados en la presente se usan para producir ácidos nucleicos que son útiles para varias aplicaciones de biología molecular, bioquímica y biotecnología.

La tecnología proporciona varias ventajas sobre las tecnologías actuales. Por ejemplo, la tecnología proporciona datos de secuencia que son mejores (por ejemplo, mayor calidad, lecturas más largas, menos errores, etc.) o comparables a las tecnologías existentes en un tiempo de ejecución más corto que las tecnologías existentes. Además, la tecnología proporciona lecturas de datos de secuencias que pueden unirse para proporcionar una lectura más larga de alta calidad.

Los encabezados de sección usados en la presente son solo para propósitos organizativos y no debe interpretarse que limitan el asunto descrito de ninguna manera. En esta descripción detallada de las varias realizaciones, a efectos de explicación, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones divulgadas. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que estas

varias realizaciones pueden ponerse en práctica con o sin estos detalles específicos. En otros casos, las estructuras y dispositivos se muestran en forma de diagrama de bloques. Además, un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que las secuencias específicas en las que se presentan y realizan los métodos son ilustrativas y se contempla que las secuencias pueden variarse.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenecen las varias realizaciones descritas en la presente. Cuando las definiciones de los términos en las referencias citadas parecen diferir de las definiciones proporcionadas en las presentes enseñanzas, prevalecerá la definición proporcionada en las presentes enseñanzas.

Definiciones

15 Para facilitar la comprensión de la presente tecnología, a continuación se definen una serie de términos y frases. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

A lo largo de la especificación y las reivindicaciones, los siguientes términos toman los significados explícitamente asociados en la presente, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La frase "en una realización" como se usa en la presente no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque puede hacerlo. Además, la frase "en otra realización" como se usa en la presente no se refiere necesariamente a una realización diferente, aunque puede hacerlo. Por tanto, como se describe a continuación, pueden combinarse fácilmente varias realizaciones de la invención.

25 Además, como se usa en la presente, el término "o" es un operador de "o" inclusivo y es equivalente al término "y/o" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "basado en" no es exclusivo y permite basarse en factores adicionales no descritos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, a lo largo de la especificación, el significado de "un", "uno" y "el" incluye referencias plurales. El significado de "en" incluye "en" y "sobre".

30 Como se usa en la presente, un "nucleótido" comprende una "base" (alternativamente, una "nucleobase" o "base nitrogenada"), un "azúcar" (en particular, un azúcar de cinco carbonos, por ejemplo, ribosa o 2-desoxirribosa), y un "fracción de fosfato" de uno o más grupos fosfato (por ejemplo, un monofosfato, un difosfato, un trifosfato, un tetrafosfato, etc. que consiste de uno, dos, tres, cuatro o más fosfatos enlazados, respectivamente). Sin la fracción de fosfato, la nucleobase y el azúcar componen un "nucleósido". Un nucleótido también puede por tanto denominarse un nucleósido monofosfato o un nucleósido difosfato o un nucleósido trifosfato, dependiendo del número de grupos fosfato unidos. La fracción de fosfato está habitualmente unida al carbono 5 del azúcar, aunque algunos nucleótidos comprenden fracciones de fosfato unidas al carbono 2 o al carbono 3 del azúcar. Los nucleótidos contienen o una base de purina (por ejemplo, en los nucleótidos adenina y guanina) o una de pirimidina (por ejemplo, en los nucleótidos citosina, timina y uracilo). Algunos nucleótidos contienen bases no naturales. Los ribonucleótidos son nucleótidos en los que el azúcar es ribosa. Los desoxirribonucleótidos son nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa.

45 Como se usa en la presente, un "ácido nucleico" significará cualquier molécula de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, ADN, ARN e híbridos de los mismos. Las bases de ácidos nucleicos que forman moléculas de ácidos nucleicos pueden ser las bases A, C, G, T y U, así como derivados de las mismas. Los derivados de estas bases son bien conocidos en la técnica. Debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos de ADN o ARN elaborado a partir de análogos de nucleótidos. El término tal como se usa en la presente también abarca ADNc que es ADN complementario producido a partir de una plantilla de ARN, por ejemplo, por la acción de una transcriptasa inversa. Es bien sabido que el ADN (ácido desoxirribonucleico) es una cadena de nucleótidos que consta de 4 tipos de nucleótidos: A (adenina), T (timina), C (citosina), y G (guanina), y que el ARN (ácido ribonucleico) es una cadena de nucleótidos que consiste de 4 tipos de nucleótidos: A, U (uracilo), G y C. También se sabe que estos 5 tipos de nucleótidos se unen entre sí específicamente en combinaciones llamadas pares de bases complementarias. Es decir, la adenina (A) se aparea con la timina (T) (en el caso del ARN, sin embargo, la adenina (A) se aparea con el uracilo (U)) y la citosina (C) se aparea con la guanina (G), de tal manera que cada uno de estos pares de bases forman una cadena doble. Como se usa en la presente, "datos de secuenciación de ácidos nucleicos", "información de secuenciación de ácidos nucleicos", "secuencia de ácidos nucleicos", "secuencia genómica", "secuencia genética", "secuencia de fragmentos" o "secuencia de ácidos nucleicos leída" denota cualquier información o datos que son indicativos del orden de las bases de nucleótidos (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, y timina/uracilo) en una molécula (por ejemplo, un genoma completo, un transcriptoma completo, un exoma, oligonucleótido, polinucleótido, fragmento, etc.) de ADN o ARN. Debe entenderse que las presentes enseñanzas contemplan información de secuencia obtenida usando todas las variedades disponibles de técnicas, plataformas o tecnologías, incluyendo, pero no limitadas a: electroforesis capilar, micromatrices, sistemas basados en ligadura, sistemas basados en polimerasa, sistemas basados en hibridación, sistemas directos o indirectos de identificación de nucleótidos, pirosecuenciación, sistemas de detección basados en iones o pH, sistemas basados en la firma electrónica, sistemas basados en poros (por ejemplo, nanoporos), basados en visualización, etc.

La referencia a una base, un nucleótido u otra molécula puede estar en singular o plural. Es decir, "una base" puede referirse a una sola molécula de esa base o a una pluralidad de la base, por ejemplo, en una solución.

5 Un "polinucleótido", "ácido nucleico" u "oligonucleótido" se refiere a un polímero lineal de nucleósidos (incluyendo desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o análogos de los mismos) unidos por enlaces internucleosídicos. Típicamente, un polinucleótido comprende por lo menos tres nucleósidos. Habitualmente, los oligonucleótidos varían en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo de 3 a 4, hasta varios cientos de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido como un oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras, como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, a menos que se indique lo contrario. Las letras A, C, G, y T pueden usarse para referirse a las propias bases, a nucleósidos, o a nucleótidos que comprenden las bases como es estándar en la técnica.

15 Como se usa en la presente, la frase "dNTP" significa desoxinucleótidotrifosfato, donde el nucleótido comprende una base de nucleótidos, como A, T, C, G o U.

20 El término "monómero" como se usa en la presente significa cualquier compuesto que pueda ser incorporado en una cadena molecular en crecimiento por una polimerasa dada. Tales monómeros incluyen, sin limitación, nucleótidos naturales (por ejemplo, ATP, GTP, TTP, UTP, CTP, dATP, dGTP, dTTP, dUTP, dCTP, análogos sintéticos), precursores para cada nucleótido, nucleótidos de origen no natural y sus precursores o cualquier otra molécula que pueda ser incorporada en una cadena de polímero en crecimiento por una polimerasa dada.

25 Como se usa en la presente, "complementario" generalmente se refiere a la duplicación de nucleótidos específica para formar pares de bases canónicas de Watson-Crick, como entienden los expertos en la técnica. Sin embargo, complementario también incluye el apareamiento de bases de análogos de nucleótidos que son capaces de apareamiento de bases universal con nucleótidos A, T, G o C y ácidos nucleicos bloqueados que mejoran la estabilidad térmica de los dúplex. Un experto en la técnica reconocerá que la rigurosidad de la hibridación es un determinante en el grado de coincidencia o malapareamiento en el dúplex formado por hibridación.

30 Como se usa en la presente, "fracción" se refiere a una de dos o más partes en las que se puede dividir algo, como, por ejemplo, las varias partes de un enlace, una molécula o una sonda.

35 Como se usa en la presente, un "conector" es una molécula o fracción que une dos moléculas o fracciones y/o proporciona separación entre las dos moléculas o fracciones de tal manera que puedan funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, un conector puede comprender una cadena de hidrocarburo de diamina que está unida covalentemente a través de un grupo reactivo en un extremo a una molécula análoga de oligonucleótidos y a través de un grupo reactivo en el otro extremo a un soporte sólido, como, por ejemplo, una superficie de perlas. El acoplamiento de conectores a nucleótidos y constructos de sustrato de interés puede lograrse mediante el uso de reactivos de acoplamiento que son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Efimov et al., *Nucleic Acids Res.* 27: 4416-4426, 1999). Los métodos de derivatización y acoplamiento de moléculas orgánicas son bien conocidos en las técnicas de química orgánica y bioorgánica. Un conector también puede ser escindible (por ejemplo, fotoescindible) o reversible.

45 Una "polimerasa" es una enzima generalmente para unir 3'-OH, nucleótidos de 5'-trifosfato, oligómeros y sus análogos. Las polimerasas incluyen, pero no están limitadas a, ADN polimerasas dependientes de ADN, ARN polimerasas dependientes de ADN, ADN polimerasas dependientes de ARN, ARN polimerasas dependientes de ARN, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T3, ADN polimerasa T4, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3, ARN polimerasa SP6, ADN polimerasa 1, fragmento de Klenow, ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus*, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Vent (New England Biolabs), ADN polimerasa Deep Vent (New England Biolabs), fragmento grande de ADN polimerasa Bst, Fragmento Stoeffel, ADN polimerasa 9° N, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa Tfl, polimerasa RepliPHI Phi29, ADN polimerasa Tli, ADN polimerasa beta eucariota, telomerasa, polimerasa Terminator (New England Biolabs) (por ejemplo, Terminator I, Terminator II y otras variantes), ADN polimerasa KOD HiFi. (Novagen), ADN polimerasa KOD1, Q-beta replicasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa AMV, transcriptasa inversa M-MLV, transcriptasa inversa Phi6, transcriptasa inversa VIH-1, nuevas polimerasas descubiertas por bioprospección y las polimerasas citadas en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2007/0048748 y en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.329.178; 6.602.695; y 6.395.524. Estas polimerasas incluyen isoformas mutantes de tipo salvaje y variantes genéticamente modificadas como polimerasas exo y otros mutantes, por ejemplo, que toleran nucleótidos modificados (por ejemplo, marcados) y los incorporan en una cadena de ácido nucleico.

60 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido sintéticamente, que sea capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de ampliación de cebador que es

complementario a una cadena de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor como una polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferiblemente de cadena sencilla para la máxima eficiencia en la amplificación, pero alternativamente puede ser de cadena doble. Si es de cadena doble, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de usarse para preparar productos de ampliación. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de ampliación en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependen de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método.

Como se usa en la presente, un "adaptador" es un oligonucleótido que se enlaza o está diseñado para enlazarse a un ácido nucleico para introducir el ácido nucleico en un flujo de trabajo de secuenciación. Un adaptador puede ser de cadena sencilla o de cadena doble (por ejemplo, un ADN de cadena doble o un ADN de cadena sencilla). Como se usa en la presente, el término "adaptador" se refiere al adaptador nucleico en un estado que no está enlazado a otro ácido nucleico y en un estado que está enlazado a un ácido nucleico.

Por lo menos una parte del adaptador comprende una secuencia conocida. Por ejemplo, algunos casos de adaptadores comprenden una secuencia de unión de cebador para la amplificación del ácido nucleico y/o para la unión de un cebador de secuenciación. Algunos adaptadores comprenden una secuencia para la hibridación de una sonda de captura complementaria. Algunos adaptadores comprenden una fracción química u otra (por ejemplo, una fracción de biotina) para la captura y/o inmovilización en un soporte sólido (por ejemplo, que comprende una fracción de avidina). Algunos casos de adaptadores comprenden un marcador, índice, código de barras, etiqueta u otra secuencia mediante la cual el adaptador y un ácido nucleico al que está unido son identificables.

Algunos adaptadores comprenden una secuencia universal. Una secuencia universal es una secuencia compartida por una pluralidad de adaptadores que de otro modo pueden tener diferentes secuencias fuera de la secuencia universal. Por ejemplo, una secuencia universal proporciona un sitio de unión de cebador común para una colección de ácidos nucleicos de diferentes ácidos nucleicos objetivo, por ejemplo, que pueden comprender diferentes códigos de barras.

Algunos casos de adaptadores comprenden una secuencia definida pero desconocida. Por ejemplo, algunos casos de adaptadores comprenden una secuencia degenerada de un número definido de bases (por ejemplo, una secuencia degenerada de 1 a 20 bases). Dicha secuencia se define incluso si no se conoce cada secuencia individual, sin embargo, dicha secuencia puede servir como índice, código de barras, etiqueta, etc., marcando fragmentos de ácido nucleico de, por ejemplo, el mismo ácido nucleico objetivo.

Algunos adaptadores comprenden un extremo romo y algunos adaptadores comprenden un extremo con un saliente de una o más bases.

En casos particulares divulgados en la presente, un adaptador comprende una fracción azido, por ejemplo, el adaptador comprende una fracción azido (por ejemplo, un azido-metilo) en su extremo 5'. Por tanto, algunos casos están relacionadas con adaptadores que son o que comprenden un oligonucleótido modificado con 5'-azido u un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo.

En algunos casos, se usa un índice único (un "marcador" en algunos casos) para asociar un fragmento con el ácido nucleico plantilla a partir del cual se produjo. En algunos casos, un índice único es una secuencia única de nucleótidos sintéticos o una secuencia única de nucleótidos naturales que permite una fácil identificación del ácido nucleico objetivo dentro de una colección complicada de oligonucleótidos (por ejemplo, fragmentos) que contienen varias secuencias. En ciertos casos, los identificadores de índice únicos se unen a fragmentos de ácidos nucleicos antes de unir las secuencias del adaptador. En algunos casos, los identificadores de índice únicos están contenidos dentro de secuencias del adaptador de modo que la secuencia única está contenida en las lecturas de secuenciación. Esto garantiza que se puedan detectar fragmentos homólogos en función de los índices únicos que se unen a cada fragmento, proporcionando de este modo una reconstrucción inequívoca de una secuencia de consenso. Los fragmentos homólogos pueden aparecer, por ejemplo, por casualidad debido a repeticiones genómicas, dos fragmentos que se originan a partir de cromosomas homólogos o fragmentos que se originan a partir de localizaciones superpuestas en el mismo cromosoma. Los fragmentos homólogos también pueden surgir de secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, miembros de la familia de genes estrechamente relacionados, parálogos, ortólogos, ohnólogos, xenólogos y/o pseudogenes). Tales fragmentos pueden descartarse para garantizar que el ensamblaje de fragmentos largos pueda calcularse sin ambigüedades. Los marcadores pueden unirse como se ha descrito anteriormente para las secuencias del adaptador. Los índices (por ejemplo, marcadores) pueden incluirse en las secuencias del adaptador.

En algunos casos, el índice único (por ejemplo, identificador de índice, etiqueta, marcador, etc.) es un "código de barras". Como se usa en la presente, el término "código de barras" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos conocida que permite identificar alguna característica de un ácido nucleico con el que está asociado el código de barras. En algunos casos, la característica del ácido nucleico a identificar es la muestra o fuente de la que se deriva el ácido nucleico. En algunos casos, los códigos de barras tienen por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15 o más nucleótidos de longitud. En algunos casos, los códigos de barras son más cortos que 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 nucleótidos de longitud. En algunos casos, los códigos de barras asociados con algunos ácidos nucleicos tienen una longitud diferente que los códigos de barras asociados con otros ácidos nucleicos. En general, los códigos de barras tienen una longitud suficiente y comprenden secuencias que son lo suficientemente diferentes como para permitir la identificación de muestras basadas en códigos de barras con los que están asociados. En algunos casos, un código de barras y la fuente de muestra con la que está asociado pueden identificarse con precisión después de la mutación, inserción o delección de uno o más nucleótidos en la secuencia del código de barras, como la mutación, inserción o delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, cada código de barras en una pluralidad de códigos de barras difiere de cualquier otro código de barras en la pluralidad en dos o más posiciones de nucleótidos, como en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más posiciones. En algunos casos, uno o más adaptadores comprenden por lo menos una de una pluralidad de secuencias de códigos de barras. En algunos casos, Los métodos de la tecnología comprenden además identificar la muestra o fuente de la que se deriva un ácido nucleico objetivo basado en una secuencia de código de barras a la que se une el ácido nucleico objetivo. En algunos casos, los métodos de la tecnología comprenden además identificar el ácido nucleico objetivo basado en una secuencia de código de barras a la que se une el ácido nucleico objetivo. Algunos casos del método comprenden además identificar una fuente o muestra de la secuencia de nucleótidos objetivo determinando una secuencia de nucleótidos con código de barras. Algunos casos del método comprenden además aplicaciones de recuento molecular (por ejemplo, enumeración de códigos de barras digitales y/o clasificación) para determinar los niveles de expresión o el estado del número de copia de los objetivos deseados. En general, un código de barras puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que, cuando se une a un ácido nucleico objetivo, sirve como un identificador de la muestra de la que se derivó el polinucleótido objetivo.

En algunos casos, un oligonucleótido como un cebador, adaptador, etc. comprende una secuencia "universal". Una secuencia universal es una secuencia conocida, por ejemplo, para usar como un sitio de unión de cebador o sonda usando un cebador o sonda de una secuencia conocida (por ejemplo, complementaria a la secuencia universal). Aunque una secuencia específica de plantilla de un cebador, una secuencia de código de barras de un cebador y/o una secuencia de código de barras de un adaptador pueden diferir en los casos de la tecnología, por ejemplo, de fragmento a fragmento, de muestra a muestra, de fuente a fuente, o de región de interés a región de interés, los casos de la tecnología proporcionan que una secuencia universal es la misma de fragmento a fragmento, de muestra a muestra, de fuente a fuente, o de región de interés a región de interés, de tal manera que todos los fragmentos que comprenden la secuencia universal pueden manejarse y/o tratarse de la misma manera o una similar, por ejemplo, amplificados, identificados, secuenciados, aislados, etc., usando métodos o técnicas similares (por ejemplo, usando el mismo cebador o sonda).

En casos particulares, se usa un cebador que comprende una secuencia universal (por ejemplo, secuencia universal A), una secuencia de código de barras y una secuencia específica de plantilla. En casos particulares, se usa un primer adaptador que comprende una secuencia universal (por ejemplo, secuencia universal B) y en casos particulares, se usa un segundo adaptador que comprende una secuencia universal (por ejemplo, secuencia universal C). La secuencia universal A, la secuencia universal B y la secuencia universal C pueden ser cualquier secuencia. Esta nomenclatura se usa para indicar que la secuencia universal A de un primer ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal A es la misma que la secuencia universal A de un segundo ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal A, la secuencia universal B de un primer ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal B es igual a la secuencia universal B de un segundo ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal B, y la secuencia universal C de un primer ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal C es igual a la secuencia universal C de un segundo ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento) que comprende la secuencia universal C. Aunque las secuencias universales A, B y C son generalmente diferentes en los casos de la tecnología, no es necesario que lo sean. Por tanto, en algunos casos, las secuencias universales A y B son iguales; en algunos casos, las secuencias universales B y C son iguales; en algunos casos, las secuencias universales A y C son iguales; y en algunos casos, las secuencias universales A, B y C son iguales. En algunos casos, las secuencias universales A, B y C son diferentes.

Por ejemplo, si se van a secuenciar dos regiones de interés (por ejemplo, a partir de las mismas fuentes o unas diferentes o, por ejemplo, a partir de dos regiones diferentes del mismo ácido nucleico, cromosoma, gen, etc.), pueden usarse dos cebadores, un cebador que comprende una primera secuencia específica de plantilla para cebar desde la primera región de interés y un primer código de barras para asociar el primer producto amplificado con la primera región de interés y un segundo cebador que comprende una segunda secuencia específica de plantilla para cebar desde la segunda región de interés y un segundo código de barras para asociar el segundo producto amplificado con la segunda región de interés. Sin embargo, estos dos cebadores, en algunos casos, comprenderán la misma secuencia universal (por ejemplo, la secuencia universal A) para la agrupación y el procesamiento juntos en sentido descendente. Pueden usarse dos o más secuencias universales y, en general, el número de secuencias universales será menor que el número de secuencias y/o secuencias de código de barras específicas del objetivo para agrupar las muestras y el tratamiento de grupos como una única muestra (lote).

Por consiguiente, en algunos casos, determinar la primera subsecuencia de nucleótidos y la segunda

subsecuencia de nucleótidos comprende cebar desde una secuencia universal. En algunos casos, determinar la primera subsecuencia de nucleótidos y la segunda subsecuencia de nucleótidos comprende terminar la polimerización con un análogo de nucleótido 3'-O-bloqueado. Por ejemplo, en algunos casos, determinar la primera subsecuencia de nucleótidos y la segunda subsecuencia de nucleótidos comprende terminar la polimerización con un análogo de nucleótido de 3'-O-alquino, por ejemplo, en algunos casos, determinar la primera subsecuencia de nucleótidos y la segunda subsecuencia de nucleótidos comprende terminar la polimerización con un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo. En algunos casos, determinar la primera subsecuencia de nucleótidos y la segunda subsecuencia de nucleótidos comprende terminar la polimerización con un análogo de nucleótido que comprende un terminador reversible.

Las lecturas de secuencia corta obtenidas se dividen de acuerdo con su código de barras (es decir, se demultiplexan) y las lecturas que se originan de las mismas muestras, fuentes, regiones de interés, etc. se agrupan entre sí, por ejemplo, se guardan en archivos separados o se mantienen en una estructura de datos organizados que permite identificar las lecturas agrupadas como tales. Luego, las secuencias cortas agrupadas se ensamblan en una secuencia de consenso. El ensamblaje de secuencia puede dividirse generalmente en dos categorías amplias: ensamblaje de novo y ensamblaje de mapeo del genoma de referencia. En el ensamblaje de novo, las lecturas de secuencia se ensamblan juntas de tal manera que forman una secuencia nueva y previamente desconocida. En el mapeo del genoma de referencia, las lecturas de secuencia se ensamblan contra una secuencia de la estructura fundamental existente (por ejemplo, una secuencia de referencia, etc.) para construir una secuencia que sea similar pero no necesariamente idéntica a la secuencia principal.

Por tanto, en algunos casos, los ácidos nucleicos objetivo correspondientes a cada región de interés se reconstruyen usando un ensamblaje de novo. Para comenzar el proceso de reconstrucción, se unen bioinformáticamente lecturas cortas encontrando superposiciones y ampliándolas para producir una secuencia de consenso. En algunos casos, el método comprende además mapear la secuencia de consenso a una secuencia de referencia. Los métodos de la tecnología aprovechan las puntuaciones de calidad de la secuenciación que representan una base de llamadas de confianza para reconstruir fragmentos de longitud completa. Además del ensamblaje de novo, los fragmentos pueden usarse para obtener la separación de fases (asignación a copias homólogas de cromosomas) de variantes genómicas observando las secuencias de consenso que se originan en cualquiera de los cromosomas.

Como se usa en la presente, un "sistema" denota un conjunto de componentes, reales o abstractos, que comprende un todo en el que cada componente interactúa o está relacionado con por lo menos otro componente dentro del todo.

Varias plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos, ensamblaje de ácidos nucleicos y/o sistemas de mapeo (por ejemplo, software y/o hardware de ordenador) se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2011/0270533.

Como se usa en la presente, los términos "alquilo" y el prefijo "alqu-" incluyen tanto grupos saturados como insaturados de cadena lineal y de cadena ramificada, y de grupos cíclicos, por ejemplo, grupos cicloalquilo y cicloalqueno. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alquilo acíclicos son de 1 a 6 carbonos. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos y preferiblemente tienen de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo. Los grupos cíclicos ejemplares incluyen grupos ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y adamantilo. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes o no sustituidos. Los sustituyentes ejemplares incluyen grupos alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, halógeno, alquilsililo, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, carboxialquilo y grupos carboxilo. Cuando se usa el prefijo "alqu", el número de carbonos contenidos en la cadena de alquilo viene dado por el intervalo que precede directamente a este término, con el número de carbonos contenidos en el resto del grupo que incluye este prefijo definido en otra parte de la presente. Por ejemplo, el término "alcarilo C₁-C₄" ejemplifica un grupo arilo de 6 a 18 carbonos (por ejemplo, ver más abajo) unido a un grupo alquilo de 1 a 4 carbonos.

Como se usa en la presente, el término "alcoxi" se refiere a un sustituyente químico de la fórmula -OR, donde R es un grupo alquilo. Por "ariloxi" se entiende un sustituyente químico de la fórmula -OR', donde R' es un grupo arilo.

Como se usa en la presente, el término "alquino" se refiere a un hidrocarburo que comprende un triple enlace carbono-carbono. Un ejemplo de un grupo funcional que contiene alquino es el grupo propargilo. El propargilo es un grupo funcional alquilo de 2-propinilo con la estructura HC≡C-CH₂-, derivado del alquino propino.

Como se usa en la presente, el término "azida" o "azido" se refiere a cualquier compuesto que tenga la fracción N₃ en el mismo. La azida puede ser una azida orgánica o una azida metálica. Una reacción que involucra azidas es un tipo de química clic conocida como reacción de ciclo-adición 1,3-dipolar catalizada por cobre (I). Esta reacción conjuga alquinos y azidas para formar un anillo de triazol de cinco miembros que proporciona un enlace covalente.

5 Como se usa en la presente, el término "estructura principal" se refiere a un componente estructural de una molécula de ácido nucleico que es una serie de átomos unidos covalentemente que juntos crean la cadena continua de la molécula. En los ácidos nucleicos "naturales", la estructura principal comprende enlaces fosfodiéster que enlazan azúcares alternos (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) y fracciones fosfato (relacionados con el ácido fosfórico).

10 Como se usa en la presente, un "sitio objetivo" es un sitio de un sujeto en el que se desea que se administre un agente bioactivo y que esté activo. Un sitio objetivo puede ser una célula, un tipo de célula, un tejido, un órgano, un área u otra designación de la anatomía y/o fisiología de un sujeto.

15 Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se usan indistintamente. En la presente se usan los códigos de aminoácidos convencionales de una y tres letras de la siguiente manera: Alanina: Ala, A; Arginina: Arg, R; Asparagina: Asn, N; Aspartato: Asp, D; Cisteína: Cys, C; Glutamato: Glu, E; Glutamina: Gln, Q; Glicina: Gly, G; Histidina: His, H; Isoleucina: Ile, I; Leucina: Leu, L; Lisina: Lys, K; Metionina: Met, M; Fenilalanina: Phe, F; Prolina: Pro, P; Serina: Ser, S; Treonina: Thr, T; Triptófano: Trp, W; Tirosina: Tyr, Y; Valina: Val, V. Como se usa en la presente, los códigos Xaa y X se refieren a cualquier aminoácido.

20 En algunos casos, los compuestos de la tecnología comprenden un componente o fracción de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos o derivados del mismo. Como se usa en la presente, un "anticuerpo", también conocido como "inmunoglobulina" (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), comprende dos cadenas pesadas enlazadas entre sí por enlaces disulfuro y dos cadenas ligeras, cada una de las cuales está enlazada a una cadena pesada por un enlace disulfuro. La especificidad de un anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación de antígeno del anticuerpo (o parátipo) y el determinante de antígeno (o epítipo). Los sitios de combinación de antígeno están compuestos por residuos que provienen principalmente de las regiones de hipervariabilidad o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de las regiones no hipervariables o marco influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. En algunos casos, la fracción de direccionamiento es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier molécula que contenga proteína o polipéptido que comprenda por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina como para permitir la interacción específica entre dicha molécula y un antígeno. La porción de una molécula de inmunoglobulina puede incluir, pero no se limita a, por lo menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de la misma. Tales fragmentos pueden producirse mediante escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente. Los anticuerpos también pueden producirse en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada en sentido ascendente del sitio de parada natural. Las varias porciones de anticuerpos pueden unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

45 Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab (por ejemplo, por digestión con papaína), F(ab')₂ (por ejemplo, por digestión con pepsina), Fab' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular).

50 Un fragmento Fab puede obtenerse tratando un anticuerpo con la proteasa papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica un Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariota o para el sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar el Fab. Un F(ab')₂ puede obtenerse tratando un anticuerpo con la proteasa pepsina. Además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo un Fab' mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un Fab puede obtenerse tratando F(ab')₂ con un agente reductor, por ejemplo, ditiotreitól. Además, un Fab' puede producirse insertando ADN que codifica un fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para un procariota o un vector de expresión para un eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para su expresión. Un fragmento Fv puede producirse mediante escisión restringida por pepsina, por ejemplo, a 4° C y pH 4.0. (un método denominado "digestión fría con pepsina"). El fragmento Fv consiste del dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) unidos por una interacción no covalente fuerte. Un fragmento scFv puede producirse obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL como se ha descrito anteriormente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y luego introduciendo el vector de expresión en una procariota o eucariota para expresar el scFv.

60 En general, los anticuerpos habitualmente pueden elevarse a cualquier antígeno, usando las muchas técnicas convencionales bien conocidas ahora en la técnica. Puede usarse cualquier anticuerpo de direccionamiento a un antígeno que se encuentra en una concentración suficiente en un sitio del cuerpo de un mamífero que es de interés diagnóstico o terapéutico para elaborar los compuestos proporcionados en la presente.

65

Como se usa en la presente, el término "conjugado" se refiere a cuando una molécula o agente se acopla o adhiere física o químicamente a otra molécula o agente. Los ejemplos de conjugación incluyen enlace covalente y complejación electrostática. Los términos "complejado", "complejado con" y "conjugado" se usan indistintamente en la presente.

5

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico descrito en la presente, o identificado por un método descrito en la presente, a un paciente, o la aplicación o administración del agente terapéutico a un tejido o línea celular aislados de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o un predisposición a una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

10

Como resultado de la selección de sustituyentes y patrones de sustituyentes, ciertos compuestos de la presente tecnología pueden tener centros asimétricos y pueden producirse como mezclas de estereoisómeros, o como diastereómeros individuales o enantiómeros. Todas las formas isoméricas de estos compuestos, ya sean aisladas o en mezclas, están dentro del alcance de la presente tecnología. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen tanto las sales metálicas (inorgánicas) como las sales orgánicas, una lista de las cuales se da en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edición, pág. 1418 (1985). Es bien sabido por un experto en la técnica que una forma de sal apropiada se elige en base a las propiedades físicas y químicas. Como entenderán los expertos en la técnica, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales de ácidos inorgánicos como clorhidrato, sulfato, fosfato, difosfato, bromhidrato y nitrato; o sales de un ácido orgánico como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato o palmoato, salicilato y estearato. De manera similar, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio (especialmente sales de amonio con aminas secundarias). También se incluyen dentro del alcance de esta tecnología las formas cristalinas, hidratos y solvatos.

15

20

25

Las composiciones de acuerdo con la tecnología divulgada pueden administrarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que posee la efectividad del compuesto original y no es biológicamente ni de otro modo no deseable (por ejemplo, no es tóxica ni perjudicial de otro modo para el receptor de la misma). Las sales adecuadas incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mezclando una solución del compuesto de la presente tecnología con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido benzoico. Ciertos compuestos empleados en la presente tecnología pueden llevar una fracción ácida (por ejemplo, COOH o un grupo fenólico), en cuyo caso, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio o potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio o magnesio) y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados como sales de amonio cuaternario. Además, en el caso de un grupo ácido (COOH) o alcohol que esté presente, pueden emplearse ésteres farmacéuticamente aceptables para modificar las características de solubilidad o hidrólisis del compuesto.

30

35

40

El término "administración" y variantes del mismo (por ejemplo, "administrar" un compuesto) en referencia a un compuesto significa proporcionar el compuesto o un profármaco del compuesto al individuo con necesidad de tratamiento o profilaxis. Cuando se proporciona un compuesto de la tecnología o un profármaco del mismo en combinación con uno o más de otros agentes activos, se entiende que "administración" y sus variantes incluyen la provisión del compuesto o profármaco y otros agentes al mismo tiempo o en momentos diferentes. Cuando los agentes de una combinación se administran al mismo tiempo, pueden administrarse juntos en una única composición o pueden administrarse por separado. Como se usa en la presente, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinar los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

45

50

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que los ingredientes de la composición farmacéutica deben ser compatible entre sí y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

55

El término "sujeto" como se usa en la presente se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferible un humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

El término "cantidad eficaz" como se usa en la presente significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en una célula, tejido, órgano, sistema, animal o humano que se está buscando por un investigador, veterinario, doctor médico u otro practicante clínico. En algunos casos, la cantidad eficaz es una "cantidad terapéuticamente eficaz" para el alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. En algunos casos, la cantidad eficaz es una "cantidad profilácticamente eficaz" para la profilaxis de los síntomas de la enfermedad o afección que se previene. El término también incluye en la presente la cantidad de compuesto activo suficiente para inhibir el receptor de mineralocorticoides y provocar de este modo una respuesta que se busca (por ejemplo, una "cantidad eficaz de inhibición"). Cuando el compuesto activo se administra

60

65

como la sal, las referencias a la cantidad de ingrediente activo son a la forma libre (la forma no de sal) del compuesto. En algunos casos, esta cantidad está entre 1 mg y 1000 mg por día, por ejemplo, entre 1 mg y 500 mg por día (entre 1 mg y 200 mg por día).

5 En el método de la presente tecnología, los compuestos, opcionalmente en forma de sal, pueden administrarse por cualquier medio que produzca contacto del agente activo con el sitio de acción del agente. Pueden administrarse por cualquier medio convencional disponible para su uso junto con productos farmacéuticos, ya sea como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. Pueden administrarse solos, pero típicamente se administran con un portador farmacéutico seleccionado en base a la ruta de administración
10 elegida y la práctica farmacéutica estándar. Los compuestos de la tecnología pueden, por ejemplo, administrarse por vía oral, parenteral (incluyendo inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión), por inhalación, o por vía rectal, en forma de una dosificación unitaria de una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz del compuesto y portadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables. Las preparaciones líquidas adecuadas para administración oral (por ejemplo, suspensiones, jarabes, elixires y similares) pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica y pueden emplear cualquiera de los medios habituales como agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares. Las preparaciones sólidas adecuadas para administración oral (por ejemplo, polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos) pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica y pueden emplear excipientes sólidos como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Las composiciones parenterales pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica y típicamente emplean agua estéril como portador y opcionalmente otros ingredientes, como un adyuvante de solubilidad. Las soluciones inyectables pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica en los que el portador comprende una solución salina, una solución de glucosa o una solución que contiene una mezcla de solución salina y glucosa. Una descripción adicional de los métodos adecuados para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas para su uso en la presente tecnología y de los ingredientes adecuados para su uso en dichas composiciones se proporciona en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, editado por A.R. Gennaro, Mack Publishing Co., 1990. Los compuestos de la presente tecnología pueden elaborarse mediante una variedad de métodos representados en los esquemas de reacción sintéticos proporcionados en la presente. Los materiales de partida y los reactivos usados en la preparación de estos compuestos generalmente o están disponibles en proveedores comerciales, como Aldrich Chemical Co., o se preparan por métodos conocidos por los expertos en la técnica, siguiendo los procedimientos expuestos en referencias como Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Wiley & Sons: Nueva York, Volúmenes 1-21 ; R. C. LaRock, Comprehensive Organic Transformations, 2ª edición Wiley-VCH, Nueva York 1999; Comprehensive Organic Synthesis, B. Trost and I. Fleming (Eds.) vol. 1-9 Pergamon, Oxford, 1991; Comprehensive Heterocyclic Chemistry, A. R. Katritzky y C. W. Rees (Eds) Pergamon, Oxford 1984, vol. 1-9; Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, A. R. Katritzky y C. W. Rees (Eds) Pergamon, Oxford 1996, vol. 1-1 V, y Organic Reactions, Wiley & Sons: New York, 1991, Volúmenes 1-40. Los esquemas de reacción sintética y los ejemplos proporcionados en la presente son meramente ilustrativos de algunos métodos mediante los cuales los compuestos de la presente tecnología pueden sintetizarse, y pueden realizarse varias modificaciones a estos esquemas de reacción sintética y se le sugerirá a un experto en la técnica que se haya referido a la divulgación contenida en esta solicitud.

Los materiales de partida y los productos intermedios de los esquemas de reacción sintética pueden aislarse y purificarse si se desea usando técnicas convencionales, incluyendo, pero no limitadas a, filtración, destilación, cristalización, cromatografía y similares. Tales materiales pueden caracterizarse usando medios convencionales, incluyendo constantes físicas y datos espectrales.

Descripción

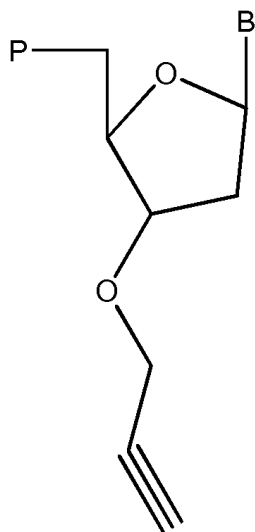
La tecnología descrita en la presente se refiere a análogos de nucleótidos y métodos, composiciones (por ejemplo, mezclas de reacción), kits y sistemas relacionados para manipular, detectar, aislar y secuenciar ácidos nucleicos. En particular, algunos casos de los análogos de nucleótidos comprenden una fracción de alquino que proporciona funcionalidades tanto de terminación como de enlace. La tecnología proporciona ventajas sobre los métodos convencionales, como un menor coste y una complejidad reducida.

55 1. Análogos de nucleótidos

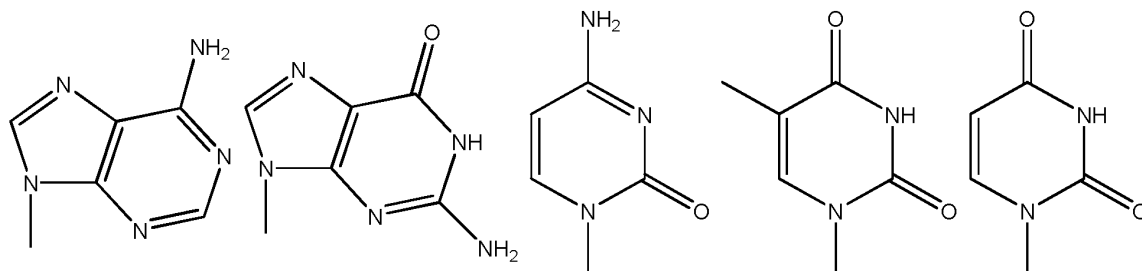
En la presente se divulgan análogos de nucleótidos. En algunos casos, los análogos de nucleótidos comprenden uno o más fracciones de terminadores alquino. Por ejemplo, en algunos casos, la tecnología proporciona un análogo de nucleótido 3'-O-bloqueado que es un análogo de nucleótido 3'-O-alquino. En algunos casos, el análogo de nucleótido 3'-O-bloqueado es un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo que tiene una estructura como se muestra a continuación:

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



en donde B es la base del nucleótido, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina o uracilo, por ejemplo, B es uno de:



o una nucleobase natural o sintética, por ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina; etc. y en donde P comprende una fracción de fosfato (por ejemplo, un monofosfato, un difosfato, un trifosfato, un tetrafosfato); un 5' hidroxilo; un alfa tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), un beta tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), y/o un gamma tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato); o un alfa metilfosfonato, un beta metilfosfonato y/o un gamma metilfosfonato, como se define en la presente.

Los análogos de nucleótidos no están limitados a un grupo fosfato específico. En algunos casos, el grupo fosfato es un grupo monofosfato o un polifosfato tal como un grupo difosfato, un grupo trifosfato o un grupo tetrafosfato. En algunos casos, el grupo fosfato es un pirofosfato. En algunos casos, P representa un grupo que comprende un hidroxilo 5'; un alfa tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato), un beta tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato) y/o un gamma tiofosfato (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato); o un alfa metilfosfonato, un beta metilfosfonato y/o un gamma metilfosfonato.

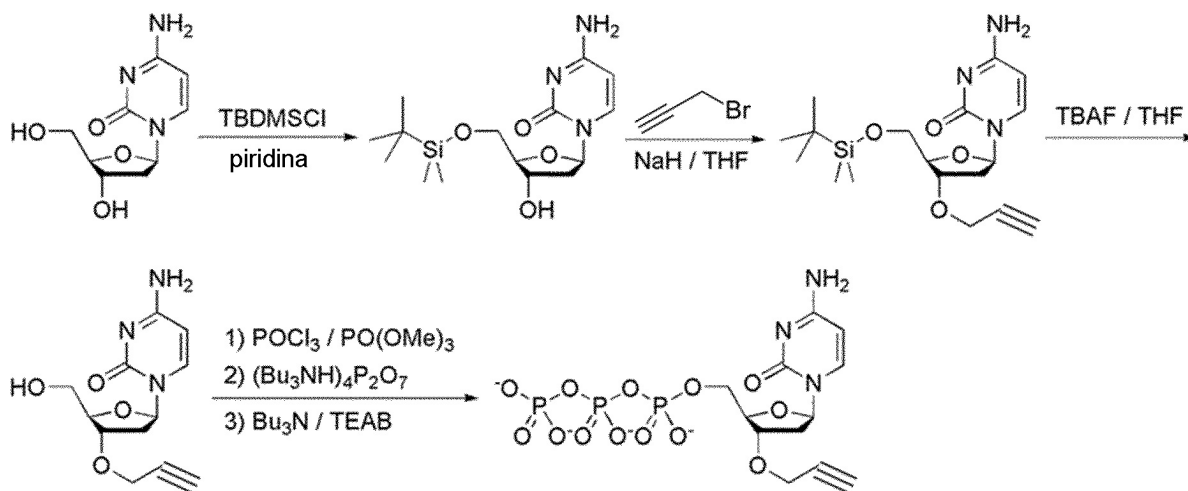
Además, la base de los análogos de nucleótidos no está limitada a una base específica. En algunos casos, la base es una adenina, citosina, guanina, timina, uracilo y análogos de los mismos como, por ejemplo, bases acíclicas. Los análogos de nucleótidos no están limitados a una fracción de azúcar específica. En algunos casos, dicha fracción de azúcar es una ribosa, desoxirribosa, didesoxirribosa y análogos, derivados y/o modificaciones de la misma (por ejemplo, una tiofuranosa, tioribosa, tiodeoxirribosa, etc.). En algunos casos, la fracción de azúcar es una arabinosa u otro carbohidrato relacionado.

En algunos casos, el análogo de nucleótido es un 3'-O-propargil-dNTP donde N se selecciona del grupo que consiste de A, C, G, T y U. En algunos casos, los análogos de nucleótidos comprenden marcadores o etiquetas detectables como una fracción ópticamente detectable (por ejemplo, un colorante fluorescente), fracciones detectables electroquímicamente (por ejemplo, un grupo activo redox), un punto cuántico, un cromógeno, un agente de contraste de imagen biológica, una etiqueta de vehículo de administración de fármacos, etc.

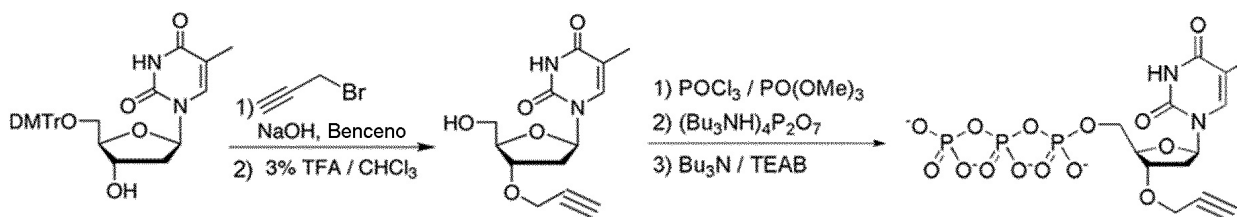
La síntesis de los compuestos proporcionados en la presente se realiza como se describe en, por ejemplo, Bentley et al. (2008) "Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry" Nature 456(7218): 53-9 y Ju et al. (2006) "Four Color DNA Sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators," PNAS ' 103(52): 19635-40, con las modificaciones necesarias para proporcionar los varios análogos de nucleótidos descritos en la presente. Adicionalmente, se usan varias caracterizaciones moleculares como NMR, espectrometría de masas y análisis de cromatografía/afinidad en algunos casos para confirmar la síntesis con éxito de los compuestos correctos.

En algunos casos, los métodos sintéticos para compuestos abarcados y contemplados por la tecnología descrita en la presente comprenden uno o más de los siguientes esquemas sintéticos o modificaciones de los mismos:

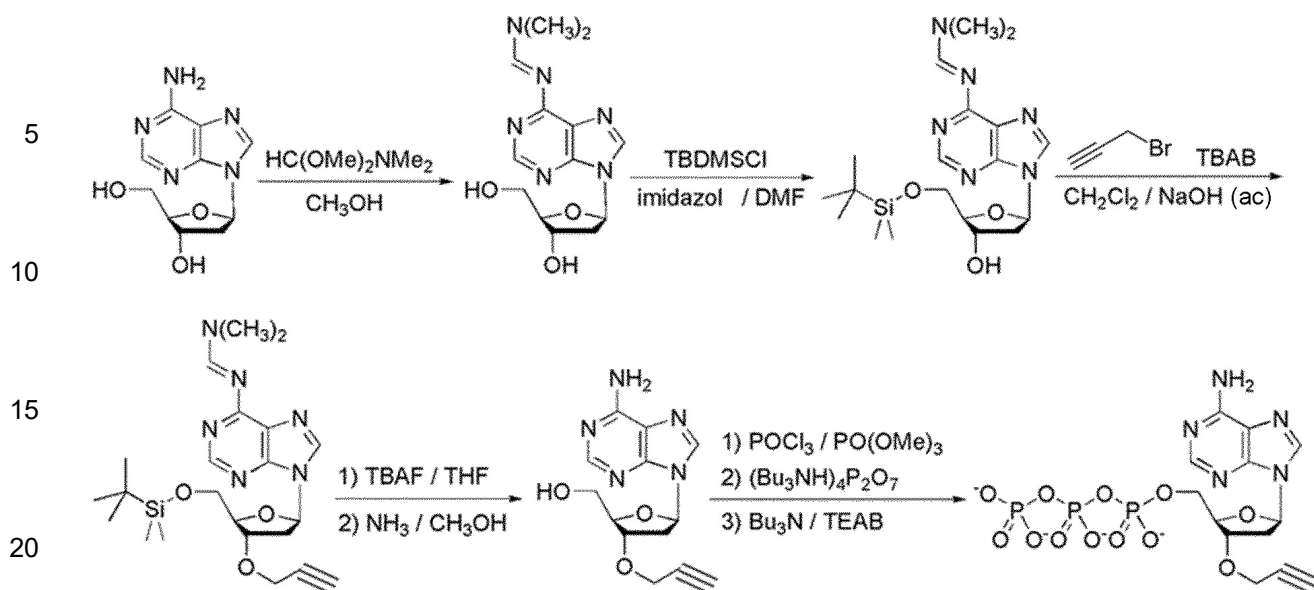
Síntesis de 3'-O-propargil dCTP



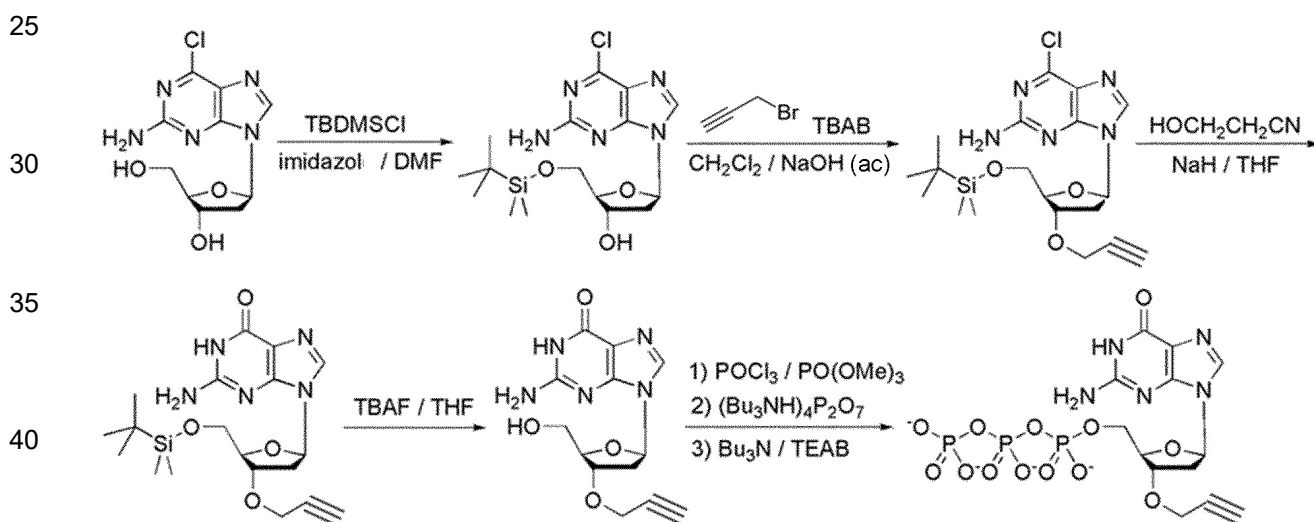
Síntesis de 3'-O-propargil dTTP



Síntesis de 3'-O-propargil dATP



Síntesis de 3'-O-propargil dGTP



45 En algunos casos, los análogos de nucleótidos se usan para incorporar fracciones de alquino en polímeros de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante una polimerasa. En algunos casos, una polimerasa se modifica para mejorar la incorporación de los análogos de nucleótidos divulgados en la presente. Polimerasas modificadas ejemplares se divulgan en las Patente de Estados Unidos N° 4.889.818; 5.374.553; 5.420.029; 5.455.170; 5.466.591; 5.618.711; 5.624.833; 5.674.738; 5.789.224; 5.795.762; 5.939.292; y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2002/0012970 y 2004/0005599. Un ejemplo no limitativo de una polimerasa modificada incluye la ADN polimerasa G46E E678G CS5, la ADN polimerasa G46E E678G CS5, la ADN polimerasa E615G Taq, la polimerasa AZ05R y la ADN polimerasa G46E L329A E678G CS5 divulgadas en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0037398. En algunos casos, la polimerasa es una polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 vendida con el nombre comercial THERMINATOR (por ejemplo, THERMINATOR II) por New England BioLabs (Ipswich, Mass.). La producción de polimerasas modificadas puede lograrse usando muchas técnicas convencionales en biología molecular y ADN recombinante descritos en la presente y conocidos en la técnica. En algunos casos, se usan mutantes de polimerasa, como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.939.292, que incorporan NTP así como dNTP.

60 En algunos casos, los análogos de nucleótidos contienen etiquetas además de fracciones de alquino (ver más arriba). En algunos casos, los análogos de nucleótidos con fracciones de alquino 3' se usan para terminar una reacción de polimerasa. Las etiquetas químicas que contienen una fracción azido pueden agregarse al polímero de ácido nucleico mediante química clic. En algunos casos, la reacción del compuesto alquino terminador con el compuesto que contiene la fracción azido forma un compuesto de triazol. En algunos casos, el compuesto de triazol funciona como una estructura fundamental de ácido nucleico y se realizan reacciones enzimáticas adicionales como

65

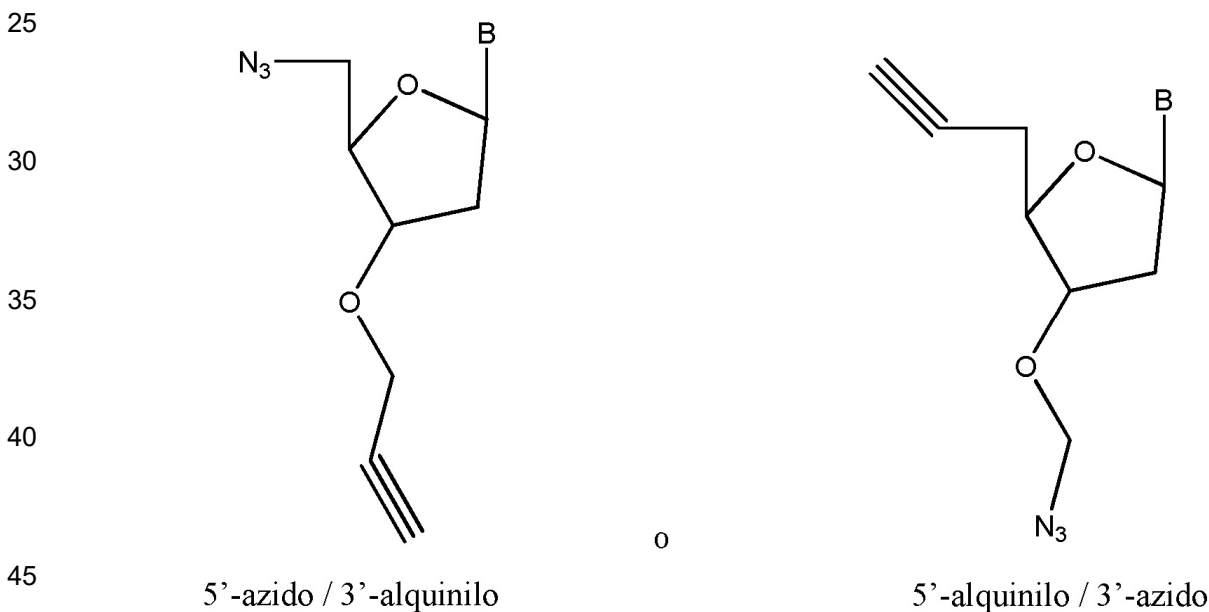
PCR en el compuesto de triazol.

2. Oligonucleótidos

5 En algunos casos, los análogos de nucleótidos encuentran uso para la síntesis de ácidos nucleicos modificados con estructura fundamental de triazol (por ejemplo, análogos de oligonucleótidos). Por ejemplo, los análogos de nucleótidos encuentran uso en métodos para la síntesis acuosa de oligonucleótidos en fase sólida. Tales métodos obvian por tanto la necesidad de, entre otras cosas, usar solventes orgánicos, pasos de desprotección y pasos de tapado en algunas síntesis convencionales; además, los métodos acuosos minimizan o eliminan la oxidación no deseada de fósforo en los compuestos sintetizados, por ejemplo, durante la síntesis del ciclo. Se contempla que una ventaja de la síntesis en fase acuosa es que es más rápida que las técnicas convencionales de síntesis en fase orgánica.

15 En algunos casos, se proporciona un oligonucleótido modificado con estructura fundamental de triazol que comprende los análogos de nucleótidos proporcionados en la presente. Es decir, los análogos de nucleótidos descritos en la presente encuentran uso en la síntesis de oligonucleótidos modificados que comprenden uno o más análogos de nucleótidos y que comprenden grupos triazol en la estructura fundamental molecular. En algunos casos, los oligonucleótidos comprenden algunos nucleótidos convencionales y algunos análogos de nucleótidos en varias proporciones. En algunos casos, los oligonucleótidos comprenden solo análogos de nucleótidos y no comprenden nucleótidos convencionales.

Por consiguiente, en algunos casos se proporciona un análogo de nucleótido como se describe en otra parte en la presente, por ejemplo, que tiene una estructura de acuerdo con:



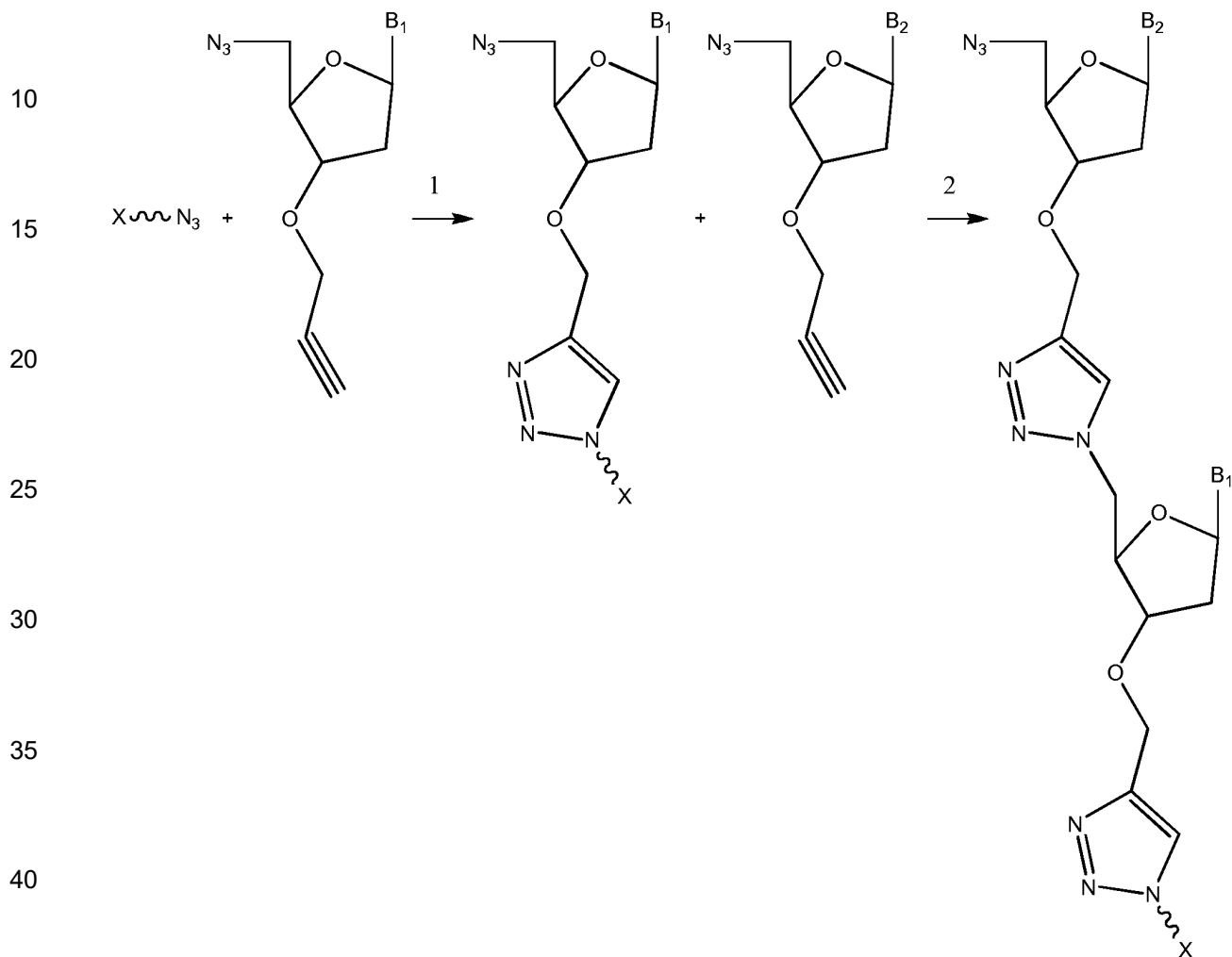
50 donde B es la base del nucleótido (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina o una nucleobase natural o sintética, por ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina; etc.).

55 Tales análogos de nucleótidos y variantes y derivados modificados de los mismos (por ejemplo, que comprenden un análogo de base o azúcar alternativo como se describe en la presente) proporcionan un análogo de nucleótido direccional, bifuncional (por ejemplo, un agente de polimerización direccional bifuncional), por ejemplo, para la síntesis de un oligonucleótido (por ejemplo, un análogo de oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido descrito en la presente). En algunos casos, el análogo de nucleótido direccional bifuncional proporciona la síntesis de un oligonucleótido en una dirección de 5' a 3' y, en algunos casos, el análogo de nucleótido direccional bifuncional proporciona la síntesis de un oligonucleótido en una dirección de 3' a 5'. En algunos casos, la síntesis del oligonucleótido comprende el uso de la fracción propargilo y un conector unido a un soporte sólido (por ejemplo, un conector (por ejemplo, un conector de carboxilato) que es escindible en condiciones ácidas (por ejemplo, ligeramente ácidas)). En algunos casos, la síntesis del oligonucleótido comprende el uso de una fracción propargilo y un conector de azida unido a un soporte sólido. En algunos casos, una fracción de propargilo 3'-tio-modificada está enlazada al soporte sólido y se escinde con un reactivo que comprende nitrato de plata o cloruro mercúrico. En algunos casos, el soporte sólido comprende un vidrio de poro controlado, sílice, sephadex, agarosa, acrilamida, látex o poliestireno, etc., proporcionados, en algunos casos, como microesferas.

65

Los esquemas sintéticos representativos para producir oligonucleótidos se proporcionan de la siguiente manera:

5 **a. Síntesis de oligonucleótidos de 3' a 5' usando análogo de nucleótido de 3'-alquínilo/5'-azido**



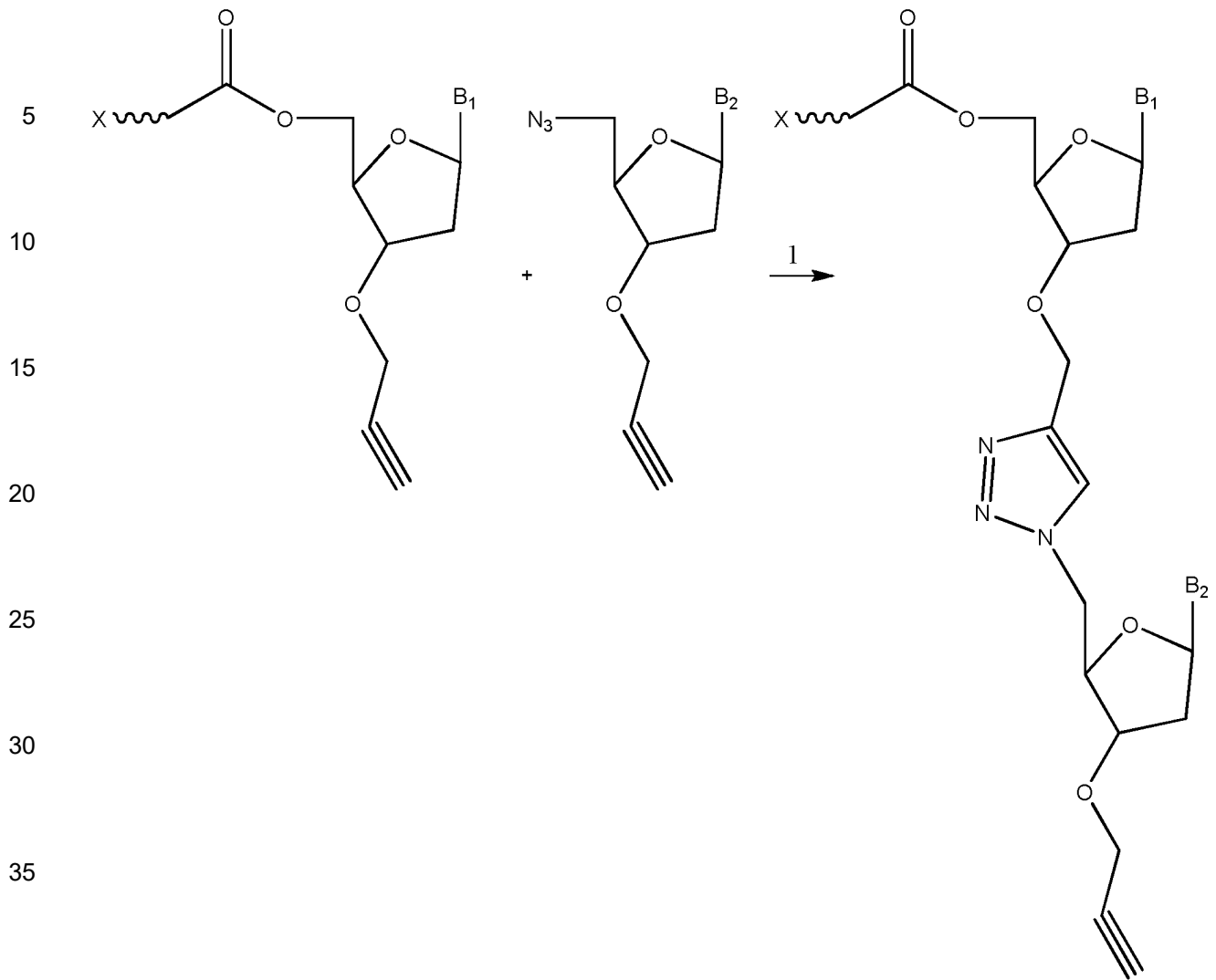
45 En el esquema sintético ejemplar a, X es un soporte sólido, la línea ondulada (~) es un conector escindible, B₁ es una primera base de nucleótidos, y B₂ es una segunda base de nucleótidos que puede ser igual o diferente a B₁. El primer paso (1) enlaza el primer análogo de nucleótido con el soporte sólido (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre). Luego, una o más series (por ejemplo, múltiples) del segundo paso (2) (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre) dan como resultado la síntesis del análogo de oligonucleótido, y cada paso añade otro análogo de nucleótido a la cadena de polímero en crecimiento.

50 **b. Síntesis de oligonucleótidos de 5' a 3' usando análogo de nucleótido de 3'-alquínilo/5'-azido**

55

60

65



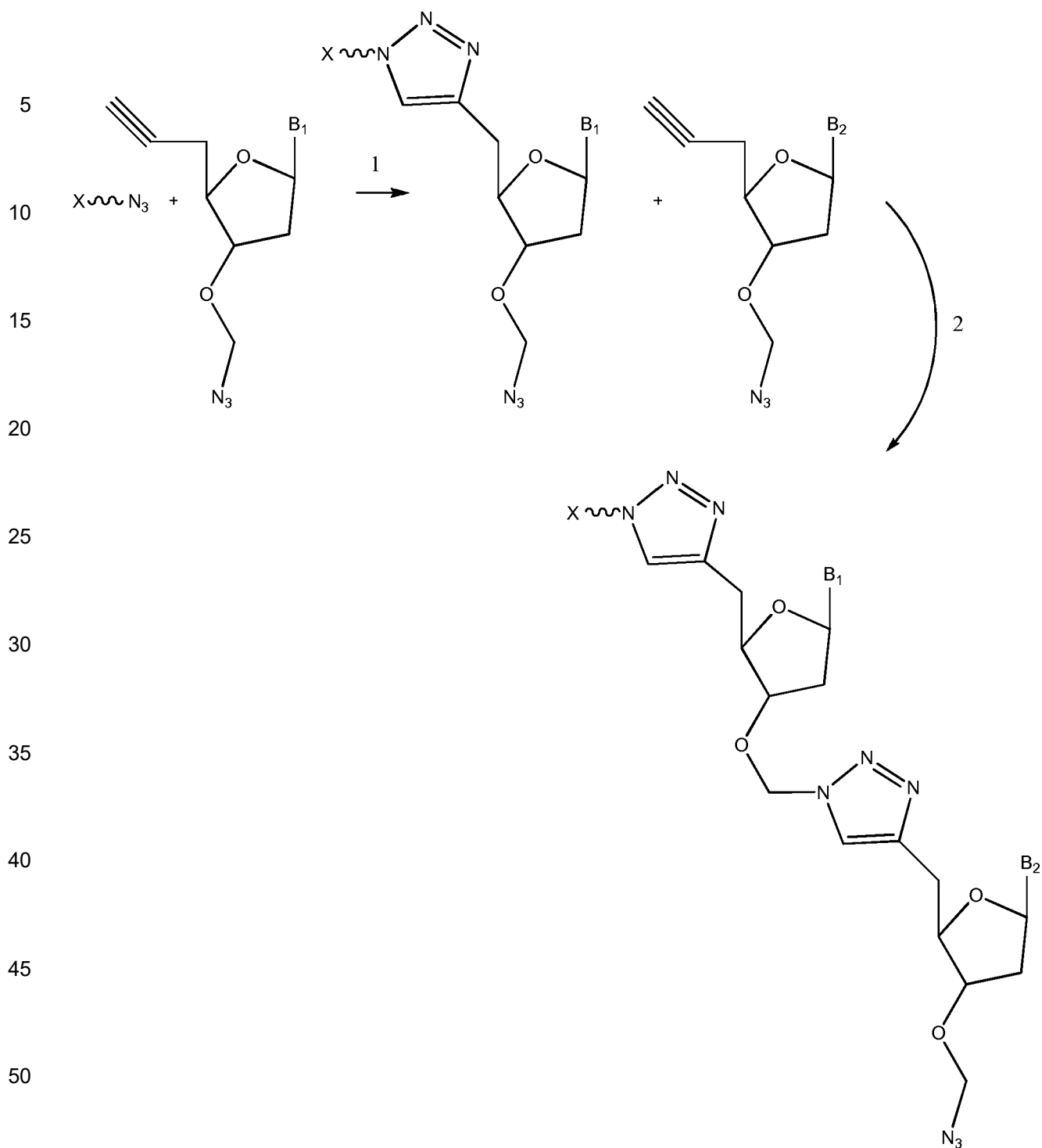
En el esquema sintético ejemplar b, X es un soporte sólido, la línea ondulada (~) es un conector escindible (por ejemplo, un conector de carboxilato), B₁ es una primera base de nucleótidos y B₂ es una segunda base de nucleótidos que puede ser la misma o diferente de B₁. Después de hacer reaccionar el primer análogo de nucleótido con el soporte sólido que comprende un conector y una fracción de carboxilato reactivo (por ejemplo, para formar un enlace de éster), una o más series (por ejemplo, múltiples) de adición de nucleótidos y reacción (1) (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre) da como resultado la síntesis del análogo de oligonucleótido, con cada paso añadiendo otro análogo de nucleótido a la cadena de polímero en crecimiento.

50 **c. Síntesis de oligonucleótidos de 5' a 3' usando análogo de nucleótido de 3'-azido/5'-alquinilo**

55

60

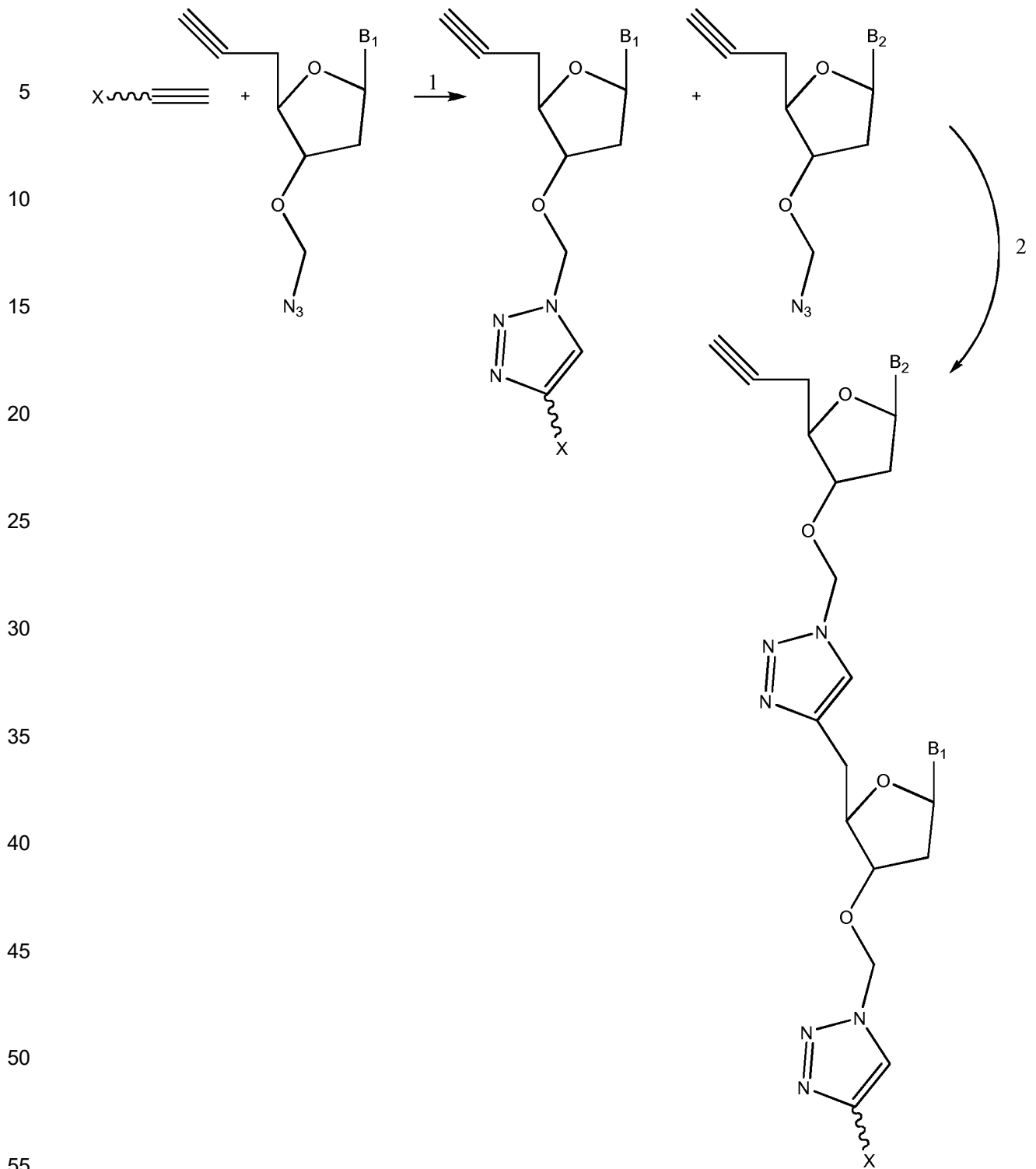
65



55 En el esquema sintético ejemplar c, X es un soporte sólido, la línea ondulada (~) es un conector escindible, B₁ es una primera base de nucleótidos, y B₂ es una segunda base de nucleótidos que puede ser igual o diferente a B₁. El primer paso (1) enlaza el primer análogo de nucleótidos al soporte sólido (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre). Luego, una o más series (por ejemplo, múltiples) del segundo paso (2) (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre) dan como resultado la síntesis del análogo de oligonucleótido, con cada paso añadiendo otro análogo de nucleótido a la cadena de polímero en crecimiento.

60 **d. Síntesis de oligonucleótidos de 3' a 5' usando análogo de nucleótido de 3'-azido/5'-alquinilo**

65



60 En el esquema sintético ejemplar d, X es un soporte sólido, la línea ondulada (~) es un conector escindible, B₁ es una primera base de nucleótidos y B₂ es una segunda base de nucleótidos que puede ser igual o diferente que B₁. El primer paso (1) enlaza el primer análogo de nucleótido al soporte sólido (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre). Luego, una o más serie (por ejemplo, múltiples) del segundo paso (2) (por ejemplo, usando una reacción de química clic, por ejemplo, usando un catalizador a base de cobre) dan como resultado la síntesis del análogo de oligonucleótido, con cada paso añadiendo otro análogo de nucleótido a la cadena de polímero en crecimiento.

65 En algunos casos, el oligonucleótido y/o análogo de nucleótido se hace reaccionar con un conector para

unir el oligonucleótido y/o análogo de nucleótido a un soporte sólido, por ejemplo, una perla, una superficie plana (una matriz), una columna, etc. El término "soporte sólido" como se usa en la presente se refiere a un material o grupo de materiales que tiene una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. En muchos casos, por lo menos una superficie del soporte sólido es sustancialmente plana, aunque en algunos casos puede ser deseable separar regiones del soporte sólido con, por ejemplo, pocillos, regiones elevadas, pasadores, zanjas grabadas o similares. De acuerdo con otros casos, el soporte sólido toma la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5.744.305 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 20090149340 y 20080038559 para sustratos ejemplares. En algunos casos, el conector es un conector escindible (por ejemplo, escindible por luz, calor, reacción química o bioquímica).

En los esquemas de síntesis ejemplares a, b, c y d, los métodos divulgados para sintetizar un oligonucleótido comprenden uno o más pasos adicionales de añadir un análogo de nucleótido, hacer reaccionar un análogo de nucleótido, lavar y/o eliminar de otro modo un análogo de nucleótido no incorporado (por ejemplo, después de un paso de síntesis), escindir un conector, aislar un oligonucleótido sintetizado, purificar un oligonucleótido sintetizado y/o añadir una etiqueta o un marcador al oligonucleótido sintetizado.

3. Etiquetado y marcado

Las metodologías de detección de ácidos nucleicos desempeñan un papel fundamental en el campo del diagnóstico molecular. La capacidad de manipular biomoléculas específica y eficientemente ha sido la fuerza impulsora central detrás de muchas tecnologías exitosas de detección de ácidos nucleicos. Entre las muchas técnicas de biología molecular, la capacidad de marcar o "etiquetar" una biomolécula de interés ha sido una tecnología clave para la posterior detección e identificación de la biomolécula.

Por consiguiente, en algunos casos, la tecnología divulgada proporciona composiciones, métodos, sistemas y kits relacionados con el etiquetado de biomoléculas como ácidos nucleicos y/o nucleótidos. En algunos casos, los nucleótidos que contienen alquino como los nucleótidos modificados con 3'-O-propargilo (por ejemplo, los 3'-O-propargilo dNTP) se incorporan en un ácido nucleico en una reacción de ampliación de polimerasa. En algunos casos, el análogo de nucleótido detiene la reacción de polimerasa. En algunos casos, el nucleótido que contiene alquino se usa (por ejemplo, sin procesamiento y/o purificación adicionales) en una reacción de etiquetado con una etiqueta modificada con azida o reactivo de marcado usando ligadura química (por ejemplo, una reacción de química clic). El enlace covalente creado usando esta química imita los enlaces fosfodiéster de ácidos nucleicos naturales, proporcionando de este modo un producto conjugado que es adecuado para su uso en reacciones enzimáticas posteriores, como una reacción de cadena de la polimerasa.

Los marcadores y las etiquetas son compuestos, estructuras o elementos que son susceptibles de por lo menos un método de detección y/o aislamiento que permite la discriminación entre diferentes marcadores y/o etiquetas. Por ejemplo, los marcadores y/o etiquetas comprenden nanocristales semiconductores, compuestos metálicos, péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas, isótopos, partículas o estructuras que tienen diferentes formas, colores, códigos de barras o patrones de difracción asociados con ellos o incorporados en ellos, cadenas de números, fragmentos al azar de proteínas o ácidos nucleicos, o diferentes isótopos.

El término "marcador" o "etiqueta" se usa indistintamente en la presente para referirse a cualquier fracción química unida a un nucleótido o ácido nucleico, en donde la unión puede ser covalente o no covalente. Preferiblemente, el marcador es detectable y hace que el nucleótido o ácido nucleico sea detectable para el profesional de la tecnología. Los marcadores detectables ejemplares que encuentran uso con la tecnología proporcionada en la presente incluyen, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un neutralizador, un marcador radiactivo, biotina y oro, o combinaciones de los mismos. Los marcadores detectables incluyen moléculas luminiscentes, fluorocromos, agentes neutralizadores fluorescentes, moléculas coloreadas (por ejemplo, cromógenos usados para la hibridación in situ (ISH, FISH) y aplicaciones de imagenología de campo brillante), radioisótopos o centelleantes. Los marcadores detectables también incluyen cualquier molécula conectora útil (como biotina, avidina, digoxigenina, estreptavidina, HRP, proteína A, proteína G, anticuerpos o fragmentos de los mismos, Grb2, polihistidina, Ni²⁺, etiquetas FLAG, etiquetas myc), metales pesados, enzimas (ejemplos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa y luciferasa), donantes/aceptores de electrones, ésteres de acridinio, colorantes y sustratos calorimétricos. También se prevé que un cambio en la masa pueda considerarse un marcador detectable, por ejemplo, como encuentra uso en la detección de resonancia de plasmones de superficie.

La tecnología también encuentra utilidad en aplicaciones como el enlace de alquinos que contienen ADN a un agente de contraste de imágenes (por ejemplo, megluminas, ferumoxsil, ferumóxidos, gadodiamida, gadoversetamida, compuestos de galio, compuestos de indio, compuestos de talio, compuestos de rubidio, compuestos de tecnecio, iopamidol, etc.), por ejemplo, para imagenología biomédica (por ejemplo, imagenología de resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada (CT), rayos X, etc.), acoplamiento de ADN a etiquetas de vehículo de administración de fármacos antisentido y/o oligo (por ejemplo, esteroides, lípidos, colesterol, vitaminas, hormonas, carbohidratos y/o ligandos específicos del receptor (por ejemplo, folato, nicotinamida, acetilcolina, GABA, glutamato, serotonina, etc.), y acoplamiento a fracciones cromógenos para aplicaciones de hibridación in situ. El

experto en la técnica reconocerá fácilmente marcadores detectables útiles que no se han mencionado anteriormente, que pueden emplearse en el funcionamiento de la presente invención.

Como tal, la tecnología no está limitada en la marcador o etiqueta que está enlazada al ácido nucleico, por ejemplo, mediante el uso de un reactivo de marcado de azida en una reacción de química clic. Por tanto, en algunos casos, el marcador comprende una fracción detectable fluorescentemente que se basa en un colorante, en donde el colorante es un xanteno, fluoresceína, rodamina, BODIPY, cianina, cumarina, pireno, ftalocianina, ficobiliproteína, ALEXA FLUOR® 350, ALEXA FLUOR® 405, ALEXA FLUOR® 430, ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 514, ALEXA FLUOR® 532, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 555, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 594, ALEXA FLUOR® 610, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 647, ALEXA FLUOR® 660, ALEXA FLUOR® 680, ALEXA FLUOR® 700, ALEXA FLUOR® 750, un cristal semiconductor fluorescente o un colorante de escuaraina. En algunos casos, el marcador o etiqueta comprende un radioisótopo, un marcador espín, un punto cuántico o una fracción bioluminiscente. En algunos casos, el marcador es una fracción detectable fluorescentemente como se describe, por ejemplo, en Haugland (septiembre de 2005) MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (10ª ed.).

En algunos casos, el marcador (por ejemplo, un marcador detectable fluorescentemente) es uno disponible de ATTO-TEC GmbH (Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Alemania), por ejemplo, como se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20110223677, 20110190486, 20110172420, 20060179585 y 20030003486; y en la patente de Estados Unidos N° 7.935.822.

En algunos casos, el ácido nucleico y/o nucleótido que comprende un nucleótido modificado, por ejemplo, que comprende un grupo alquino, está marcado con una fracción que proporciona la detección y/o aislamiento del ácido nucleico y/o nucleótido por interacción específica con una segunda fracción. Por ejemplo, en algunos casos, el ácido nucleico y/o nucleótido está enlazado (por ejemplo, mediante una reacción de química clic) a una etiqueta que comprende una azida y una fracción de biotina, un epítopo, un antígeno, un aptámero, una etiqueta de afinidad, una etiqueta de histidina, un oligonucleótido de código de barras, una cola poli-A, un oligonucleótido de captura, una proteína, un azúcar, un quelante, una etiqueta de masa (por ejemplo, grupo 2-nitro-metil-bencilo, un grupo 2-nitro-metil-3-fluorobencilo, un grupo 2-nitro- α -metil-3,4-difluorobencilo, un grupo 2-nitro- α -metil-3,4-dimetoxibencilo, un grupo 2-nitro- α -metil-bencilo, un grupo 2-nitro- α -metil-3-fluorobencilo, un grupo 2-nitro-metil-3,4-difluorobencilo, un grupo 2-nitro- α -metil-3,4-dimetoxibencilo, una etiqueta de carga).

En algunos casos, el ácido nucleico y/o nucleótido que comprende un alquino se hace reaccionar con un conector que comprende una azida para unir el ácido nucleico y/o nucleótido a un soporte sólido, por ejemplo, una perla, una superficie plana (una matriz), un columna, etc. En algunos casos, el conector es un conector escindible (por ejemplo, escindible por luz, calor, reacción química o bioquímica).

4. Reacciones

En algunos casos, la tecnología encuentra uso en el enlace de un oligonucleótido a un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN, un ARN). Por ejemplo, en algunos casos, un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico que comprende un grupo alquino, por ejemplo, un nucleótido de 3'-O-propargilo, por ejemplo, un 3'-O-propargilo dNTP) está enlazado a un oligonucleótido que comprende un grupo (por ejemplo, un grupo azida) que es químicamente reactivo con la fracción química del análogo de nucleótido, por ejemplo, mediante una reacción de química clic. En algunos casos, el oligonucleótido es de cadena sencilla y en algunos casos el oligonucleótido es de cadena doble. En algunos casos, el ácido nucleico es un ADN y en algunos casos, el ácido nucleico es un ARN; en algunos casos el oligonucleótido es un ADN y en algunos casos el oligonucleótido es un ARN.

En algunos casos, los métodos de la tecnología divulgada en la presente implican unir un adaptador a un ácido nucleico. En algunos casos, un adaptador comprende una fracción funcional para la ligadura química a un análogo de nucleótido. Por ejemplo, en algunos casos, un adaptador comprende un grupo azida (por ejemplo, en el extremo 5') que es reactivo con un grupo alquino (por ejemplo, un grupo propargilo, por ejemplo, en el extremo 3' de un ácido nucleico que comprende el análogo de nucleótido), por ejemplo, mediante una reacción de química clic (por ejemplo, usando un reactivo catalizador de cobre (por ejemplo, a base de cobre)).

En algunos casos, el alquino es un grupo butargilo o un derivado estructural del mismo. En algunos casos, el alquino comprende un átomo de azufre, por ejemplo, para proporcionar un grupo tio-alquino, un grupo tio-propargilo (por ejemplo, 3'-S-propargilo), o un derivado estructural del mismo.

En algunos casos, los adaptadores comprenden una secuencia universal y/o un índice, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos con código de barras. Adicionalmente, los adaptadores pueden contener uno o más de una variedad de elementos de secuencia, que incluyen pero no están limitados a, una o más secuencias de apareamiento del cebador de amplificación o complementos de las mismas, una o más secuencias de apareamiento del cebador de secuenciación o complementos de las mismas, una o más secuencias de códigos de barras, una o

más secuencias comunes compartidas entre múltiples adaptadores diferentes o subconjuntos de diferentes adaptadores (por ejemplo, una secuencia universal), uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, uno o más salientes complementarios a uno o más salientes de polinucleótidos objetivo, uno o más sitios de unión de sonda (por ejemplo, para la unión a una plataforma de secuenciación, como una celda de flujo para secuenciación paralela masiva, como la desarrollada por Illumina, Inc.), una o más secuencias aleatorias o casi aleatorias (por ejemplo, uno o más nucleótidos seleccionados aleatoriamente de un conjunto de dos o más nucleótidos diferentes en una o más posiciones, con cada uno de los diferentes nucleótidos seleccionados en una o más posiciones representadas en un grupo de adaptadores que comprenden la secuencia aleatoria) y combinaciones de los mismos. Dos o más elementos de secuencia pueden ser no adyacentes entre sí (por ejemplo, separados por uno o más nucleótidos), adyacentes entre sí, parcialmente solapados o completamente solapados. Por ejemplo, una secuencia de apareamiento de cebador de amplificación también puede servir como secuencia de apareamiento de cebador de secuenciación. Los elementos de secuencia pueden estar localizados en o cerca del extremo 3', en o cerca del extremo 5', o en el interior del oligonucleótido adaptador. Cuando un oligonucleótido adaptador es capaz de formar una estructura secundaria, como una horquilla, los elementos de secuencia pueden estar localizados parcial o completamente fuera de la estructura secundaria, parcial o completamente dentro de la estructura secundaria, o entre secuencias que participan en la estructura secundaria. Por ejemplo, cuando un oligonucleótido adaptador comprende una estructura de horquilla, los elementos de secuencia pueden estar localizados o completamente dentro o fuera de las secuencias hibridables (el "tallo"), incluso en la secuencia entre las secuencias hibridables (el "giro"). En algunos casos, los oligonucleótidos adaptadores en una pluralidad de oligonucleótidos adaptadores que tienen diferentes secuencias de códigos de barras comprenden un elemento de secuencia común entre todos los oligonucleótidos adaptadores en la pluralidad. Una diferencia en los elementos de secuencia puede ser tal que por lo menos una parte de los diferentes adaptadores no se alineen completamente, por ejemplo, debido a cambios en la longitud de la secuencia, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos, o un cambio en la composición de nucleótidos en una o más posiciones de nucleótidos (como un cambio de base o modificación de base). En algunos casos, un oligonucleótido adaptador comprende un saliente 5', un saliente 3', o ambos, que es complementario a uno o más polinucleótidos objetivo. Los salientes complementarios pueden tener uno o más nucleótidos de longitud, incluyendo pero no limitados a, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleótidos de longitud. Los salientes complementarios pueden comprender una secuencia fija. Los salientes complementarios pueden comprender una secuencia aleatoria de uno o más nucleótidos, de tal manera que uno o más nucleótidos se seleccionen al azar de un conjunto de dos o más nucleótidos diferentes en una o más posiciones, con cada uno de los diferentes nucleótidos seleccionados en una o más posiciones representados en un grupo de adaptadores con salientes complementarios que comprenden la secuencia aleatoria. En algunos casos, un saliente del adaptador es complementario a un saliente del polinucleótido objetivo producido por digestión con endonucleasa de restricción. En algunos casos, un saliente del adaptador consiste de una adenina o una timina.

En algunos casos, las secuencias adaptadoras contienen un elemento de identificación del sitio de unión molecular para facilitar la identificación y el aislamiento del ácido nucleico objetivo para aplicaciones posteriores. La unión molecular como mecanismo de afinidad permite que la interacción entre dos moléculas dé como resultado un complejo de asociación estable. Las moléculas que pueden participar en las reacciones de unión molecular incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas orgánicas pequeñas como ligandos, péptidos, o fármacos.

Cuando se usa un sitio de unión molecular de ácido nucleico como parte del adaptador, puede usarse para emplear la hibridación selectiva para aislar una secuencia objetivo. La hibridación selectiva puede restringir la hibridación sustancial a los ácidos nucleicos objetivo que contienen el adaptador con el sitio de unión molecular y los ácidos nucleicos de captura, que son lo suficientemente complementarios al sitio de unión molecular. Por tanto, a través de la "hibridación selectiva" se puede detectar la presencia del polinucleótido objetivo en una muestra impura que contiene un grupo de muchos ácidos nucleicos. Un ejemplo de un sistema de aislamiento de hibridación selectiva nucleótido-nucleótido comprende un sistema con varios nucleótidos de captura, que son secuencias complementarias de los elementos de identificación de unión molecular, y opcionalmente están inmovilizados en un soporte sólido. En otros casos, los polinucleótidos de captura son complementarios a las propias secuencias objetivo o un código de barras o etiqueta única contenida dentro del adaptador. Los polinucleótidos de captura pueden inmovilizarse en varios soportes sólidos, como dentro de un pocillo de una placa, esferas monodispersadas, micromatrices o cualquier otra superficie de soporte adecuada conocida en la técnica. Los polinucleótidos adaptadores complementarios hibridados unidos en el soporte sólido pueden aislarse lavando los ácidos nucleicos no de unión no deseados, dejando atrás los polinucleótidos objetivo deseables. Si las moléculas adaptadoras complementarias se fijan a esferas paramagnéticas o tecnología de perlas similar para el aislamiento, entonces las esferas pueden mezclarse en un tubo junto con el polinucleótido objetivo que contiene los adaptadores. Cuando las secuencias adaptadoras se han hibridado con las secuencias complementarias fijadas a las esferas, las moléculas no deseables pueden lavarse mientras las esferas se mantienen en el tubo con un imán o un agente similar. Las moléculas objetivo deseadas pueden liberarse posteriormente aumentando la temperatura, cambiando el pH, o usando cualquier otro método de elución adecuado conocido en la técnica.

Como se describe en otra parte en la presente, un "código de barras" u "oligonucleótido de código de barras" es una secuencia de ácidos nucleicos conocida que permite identificar alguna característica de un ácido

nucleico con el que está asociado el código de barras. Por ejemplo, en algunos casos, la característica del ácido nucleico a identificar es la muestra o fuente de la que se deriva el ácido nucleico. La secuencia de código de barras incluye generalmente ciertas características que hacen que la secuencia sea útil, por ejemplo, en reacciones de secuenciación. Por ejemplo, las secuencias de códigos de barras están diseñadas para tener regiones de homopolímero mínimas o ninguna, por ejemplo, 2 o más de la misma base en una fila, como AA o CCC, dentro de la secuencia de códigos de barras. En algunos casos, las secuencias de código de barras también están diseñadas de tal manera que están por lo menos una distancia de edición alejadas de la orden de adición de base cuando se realiza una manipulación o proceso de biología molecular, como secuenciación base por base, asegurando que la primera y la última bases no coincidan con las bases esperadas de la secuencia.

En algunos casos, las secuencias de códigos de barras están diseñadas de tal manera que cada secuencia se correlaciona con un ácido nucleico particular. Los métodos para diseñar conjuntos de secuencias de códigos de barras se muestran, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.235.475. En algunos casos, las secuencias de códigos de barras varían de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos. En una realización particular, las secuencias de código de barras varían de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 7 nucleótidos. En algunos casos, las longitudes y secuencias de secuencias de códigos de barras están diseñadas para lograr un nivel deseado de precisión para determinar la identidad de un ácido nucleico. Por ejemplo, en algunos casos, las secuencias de códigos de barras están diseñadas de tal manera que después de un número tolerable de mutaciones de punto, la identidad del ácido nucleico asociado se deduce con la precisión deseada. En algunos casos, una transposasa de Tn-5 (disponible comercialmente de Epicenter Biotechnologies; Madison, Wis.) corta un ácido nucleico en fragmentos e inserta pedazos cortos de ADN en los cortes. Los pedazos cortos de ADN se usan para incorporar las secuencias de códigos de barras.

Los métodos para diseñar conjuntos de secuencias de códigos de barras y otros métodos para unir adaptadores (por ejemplo, que comprenden secuencias de códigos de barras) se muestran en las Patente de Estados Unidos N° 6.138.077; 6.352.828; 5.636.400; 6.172.214; 6.235.475; 7.393.665; 7.544.473; 5.846.719; 5.695.934; 5.604.097; 6.150.516; RE39,793; 7.537.897; 6.172.218; y 5.863.722.

Con los cambios apropiados en los esquemas de reacción, se considera que el uso de análogos de nucleótidos 5' alquino/3' azido y 5' azido/3' alquino son intercambiables en reacciones con los sustratos reactivos apropiados para enlazar a los extremos 5' y/o 3' de análogos de nucleótidos, por ejemplo, mediante química clic.

En algunos casos, la tecnología encuentra uso en una reacción de ampliación de cebador (ver, por ejemplo, Figura 1) y/o ligadura de adaptador (ver, por ejemplo, Figura 1). En casos particulares, un cebador apareado con una plantilla (por ejemplo, un ácido nucleico diana) se amplía por una polimerasa, que añade un análogo de nucleótido al cebador. Mientras que la Figura 1 muestra la adición ejemplar de un análogo de nucleótido que contiene G a través de la base C en la plantilla, la tecnología de ampliación de cebadores no está limitada en las bases que se añaden. Luego, en algunos casos, un ADN modificado con azida (por ejemplo, un adaptador, por ejemplo, un adaptador que comprende un sitio de unión del cebador y/o un código de barras) se liga al producto de ampliación del cebador (por ejemplo, mediante química clic). El producto de ligadura comprende un enlace que imita la estructura fundamental de ácido nucleico convencional, por ejemplo, un triazol, y que es biocompatible con reacciones enzimáticas y/o químicas descendentes, por ejemplo, PCR (por ejemplo, ver Figura 1).

5. Secuenciación

En algunos casos, los análogos de nucleótidos encuentran uso en la secuenciación de ácidos nucleicos, por ejemplo, "secuenciación de próxima generación" (NGS). Por ejemplo, la secuenciación de ADN por síntesis (SBS) implica determinar la secuencia de ADN mediante la detección de ciertas señales (por ejemplo, grupos de pirofosfato) que se generan cuando se incorpora un nucleótido por una reacción de polimerasa. Otros métodos de SBS implican medios alternativos para detectar la adición de nucleótidos a la polimerasa, como la detección de emisión de luz, cambio en la fluorescencia, cambio en el pH o algún otro cambio físico o químico. Por ejemplo, la secuenciación del terminador reversible de Illumina se basa en bases terminadoras reversibles que contienen colorantes. Cuando se añade una de estas bases al polímero de ácido nucleico en crecimiento, la reacción se detiene y el colorante en el ácido nucleico terminal es detectable. La molécula que contiene el terminador puede tratarse luego con una enzima de escisión que invierte la terminación y permite la adición de nucleótidos adicionales. Este proceso por pasos es una mejora sobre la tecnología anterior, pero el paso de escisión extra y la purificación e muestras posterior deja sitio para mejoras adicionales.

En algunos casos, la presente invención proporciona nucleótidos terminadores funcionales que contienen 3'-alquinos que se incorporan en un polímero de ácido nucleico en crecimiento y terminan la reacción de ampliación. El 3'-alquino puede usarse inmediatamente en una reacción con una etiqueta modificada con azida a través de química clic. El enlace creado a través de la química clic imita un enlace fosfodiéster de ácido nucleico natural y proporciona el uso del producto conjugado en reacciones enzimáticas posteriores como la PCR. De esta manera, algunos casos de la presente invención evitan el paso de escisión del terminador de la reacción de secuenciación del terminador reversible y, por lo tanto, disminuyen el tiempo de ejecución de la reacción (ver, por ejemplo, la

realización representada en la Figura 2).

En algunos casos, se usa un análogo de nucleótido, por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-alquino (por ejemplo, un análogo de nucleótido de 3'-O-propargilo 3 como un 3'-O-propargilo dNTP) en una reacción de polimerasa y se fabrican productos de ampliación de ácido nucleico en los que el extremo 3' comprende un grupo alquino. Los productos de ácido nucleico modificado con alquino pueden usarse posteriormente como un sustrato específico en reacciones de ligadura química con compuestos que contienen fracciones de azido a través de química clic (por ejemplo, una reacción de ciclo-adición 1,3-dipolar catalizada con cobre (I)). Este tipo de química clic conjuga alquinos y azidas, formando un enlace covalente (por ejemplo, un anillo de triazol de cinco miembros) entre el compuesto que contiene alquino y el compuesto que contiene azida. Por ejemplo, un fragmento de ADN modificado con 5'-azida puede ligarse químicamente a un fragmento de ADN modificado con 3'-alquino usando química clic. Este producto de ADN conjugado puede usarse como entrada en reacciones enzimáticas posteriores, como PCR o secuenciación, porque el enlace covalente creado por el anillo de triazol de cinco miembros imita el enlace fosfodiéster natural de la estructura fundamental de ADN y no inhibe de manera significativa y/o detectable actividades enzimáticas posteriores.

Las reacciones contempladas que involucran los análogos de nucleótidos proporcionan múltiples eventos potenciales de detección. En algunos casos, el análogo de nucleótido incorpora un fluoróforo específico en la cadena de ácido nucleico que se alarga. En algunos casos, la adición del análogo de nucleótido crea una señal detectable como pirofosfato. En algunos casos, la incorporación del análogo de nucleótido puede detectarse por emisión de luz, cambio en fluorescencia, cambio en pH, cambio en conformación o algún otro cambio químico. En algunos casos, la reacción de química clic entre el análogo de nucleótido incorporado y un compuesto que comprende una fracción de azido puede detectarse de manera similar a la incorporación del análogo de nucleótido.

Debido a la química clic, los análogos de nucleótidos que contienen alquino reaccionan fácilmente con compuestos que contienen fracciones de azido. Usando esta química clic pueden insertarse varias etiquetas covalentemente en una cadena de ácido nucleico que se alarga que contiene uno de los análogos de nucleótidos. Los ejemplos de tales etiquetas incluyen, pero no están limitados a, colorantes fluorescentes, ADN, ARN, oligonucleótidos, nucleósidos, proteínas, aminoácidos, polipéptidos, polisacáridos, ácido nucleico, polímeros sintéticos y virus.

La tecnología se refiere en algunas realizaciones a métodos para secuenciar un ácido nucleico. En algunos casos, la secuenciación se realiza mediante la siguiente secuencia de eventos con el uso ejemplar de un análogo de nucleótido que comprende una fracción de 3'-O-propargilo. Primero, el análogo de nucleótido se orienta en el sitio activo de la polimerasa (por ejemplo, por una polimerasa) para el apareamiento de bases con una base complementaria de la cadena plantilla y ser adyacente al hidroxilo 3' libre de la cadena sintetizada en crecimiento. A continuación, se añade el análogo de nucleótido al extremo 3' de una cadena en crecimiento por la polimerasa, por ejemplo, mediante ataque catalizado por enzimas del hidroxilo 3' sobre el fosfato alfa del análogo de nucleótido. La ampliación adicional de la cadena por la polimerasa es bloqueada por el grupo de terminación 3'-O-propargilo en el análogo de nucleótido incorporado. En algunos casos, la cadena se somete luego a una reacción de PCR y se usa en varios métodos de secuenciación.

En algunos casos, la fracción de terminación de 3'-O-propargilo se trata con una molécula de ADN etiquetada con azida. Esto elimina el terminador alquino. Una vez que se ha eliminado el terminador, la cadena en crecimiento está libre para una polimerización adicional: la siguiente base se incorpora para continuar otro ciclo, por ejemplo, un análogo de nucleótido se orienta en el sitio activo de polimerasa, el análogo de nucleótido se añade al extremo 3' de la cadena creciente por la polimerasa, y el análogo de nucleótido se consulta para identificar la base añadida.

Algunos casos se refieren a secuenciación paralela (por ejemplo, paralela masiva).

En algunas realizaciones, la tecnología descrita en la presente está relacionada con un método para secuenciar ácidos nucleicos que comprende: hibridar un cebador con un ácido nucleico para formar un complejo de cebador/ácido nucleico hibridado, proporcionar una pluralidad de análogos de nucleótidos como se expone en la reivindicación 12, hacer reaccionar el complejo de cebador/ácido nucleico hibridado y el análogo de nucleótido con una polimerasa para añadir el análogo de nucleótido al cebador mediante una reacción de polimerasa para formar un producto ampliado que comprende un análogo de nucleótido incorporado, consultar el producto ampliado para identificar el análogo de nucleótido incorporado, hacer reaccionar el producto ampliado con un compuesto que contiene azida para formar una estructura que comprende un anillo de triazol. Los análogos de nucleótidos comprenden 3'-O-propargil-DNTP donde N se selecciona del grupo que consiste de A, C, G, T y U. En algunas realizaciones, el conjugado de ácido nucleico que comprende un anillo de triazol se usa en reacciones enzimáticas posteriores como la reacción de cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, el método incluye proporcionar nucleótidos convencionales durante el mismo paso en el que se proporcionan los análogos de nucleótidos.

En algunas realizaciones particulares que comprenden el uso de una polimerasa para incorporar los

análogos de nucleótidos en un ácido nucleico (por ejemplo, PCR, ampliación de cebador, secuenciación de ADN (por ejemplo, NGS), ampliación de base única, etc.), la polimerasa es una polimerasa obtenida de, derivada de, aislada de, clonada de, etc. de una especie *Thermococcus* (por ejemplo, un organismo del linaje taxonómico Archaea; Euryarchaeota; Thermococci; Thermococcales; Thermococcaceae; *Thermococcus*). En algunas realizaciones, la polimerasa se obtiene de, deriva de, aísla de, clona de, etc. de una especie *Thermococcus* 9°N-7 (ver, por ejemplo, Southworth, et al. (1996) "Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine Archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9°N-7 and mutations affecting 3'-5' exonuclease activity" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5281. La secuencia de nucleótidos que codifica la polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 de tipo salvaje es proporcionada por el Número de Registro GenBank U47108 (por ejemplo, el gen de la polimerasa comienza en el nucleótido 40 del Número de Registro U47108) y la secuencia de aminoácidos de la polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 de tipo salvaje es proporcionada por el Número de Registro de GenBank AAA88769.

En algunas realizaciones, la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de sustratos modificados como didesoxinucleótidos, ribonucleótidos y aciconucleótidos modificados. En algunas realizaciones la polimerasa comprende sustituciones de aminoácidos que proporcionan una incorporación mejorada de análogos de nucleótidos que comprenden grupos funcionales 3' modificados como los 3'-O-propargilo dNTP3 descritos en la presente. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la polimerasa comprende una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la polimerasa de tipo salvaje de *Thermococcus* sp. 9°N-7, por ejemplo, una sustitución de alanina por el ácido aspártico en la posición de aminoácidos 141 (D141A), una sustitución de alanina por el ácido glutámico en la posición de aminoácidos 143 (E143A), un sustitución de valina por la tirosina en la posición de aminoácidos 409 (Y409V), y/o una sustitución de leucina por la alanina en la posición de aminoácidos 485 (A485L).

En algunas realizaciones, la polimerasa se proporciona en un organismo huésped heterólogo como *Escherichia coli* que comprende un gen de polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 clonado, por ejemplo, que comprende una o más mutaciones (por ejemplo, D141A, E143A, Y409V y/o A485L). En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa de *Thermococcus* sp. 9°N-7 vendida bajo el nombre comercial THERMINATOR (por ejemplo, THERMINATOR II) por New England Biolabs (Ipswich, Mass.).

En algunos casos, los métodos para producir mutantes de polimerasa y examinar sus actividades (por ejemplo, incorporación de nucleótidos modificados) se describen, por ejemplo, en Gardner y Jack (1999) "Determinants of nucleotide sugar recognition in an archaeon DNA polymerase" *Nucleic Acids Research* 27(12): 2545. En particular, los métodos para producir e identificar mutantes de polimerasa que incorporan nucleótidos modificados se proporcionan, por ejemplo, por Gardner y Jack (2002): "Acyclic and dideoxy terminator preferences denote divergent sugar recognition by archaeon and Taq DNA polymerases" *Nucleic Acids Research* 30(2): 605. Ensayos adicionales para caracterizar la incorporación de nucleótidos modificados por varias polimerasas se describen, por ejemplo, en Ruparel et al. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 26: 5932; Barnes (1978). *J. Mol. Biol.* 119: 83; Sanger et al. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5463; Haff and Simirnov (1997) *Genome Methods* 7: 378; y en la Patente de Estados Unidos N° 5.558.991.

6. Usos

Los análogos de nucleótidos divulgados en la presente encuentran uso en una amplia gama de aplicaciones. Ejemplos no limitativos de usos para los análogos de nucleótidos descritos incluyen el uso como agentes antivirales y/o anticancerosos. En algunos casos, los análogos de nucleótidos proporcionados en la presente encuentran uso en imagenología médica de diagnóstico, por ejemplo, como agentes de contraste para uso en, por ejemplo, MRI, tomografía computarizada (TC), imágenes de rayos X, angiografía (por ejemplo, venografía, angiografía de sustracción digital, (DSA), arteriografía), urografía intravenosa, pielografía intravenosa, mielografía, medicina intervencionista (por ejemplo, angioplastia (por ejemplo, angioplastia transluminal percutánea), ablación y/u oclusión de las arterias (por ejemplo, para tratar el cáncer y/o anomalías vasculares), y colocación de stents), artrografía, sialografía, coledocopancreatografía retrógrada, cistografía miccional, etc. Usos ilustrativos adicionales y no limitativos para tales agentes de contraste incluyen imagenología un vivo para diagnósticos en humanos, descubrimiento de fármacos, y desarrollo de fármacos en sistemas de modelos (modelos de ratón, etc.).

En algunos casos, un oligonucleótido que comprende uno o más análogos de nucleótidos descritos en la presente encuentra uso en un nanoconjugado (por ejemplo, que comprende nanopartículas como nanopartículas de dióxido de titanio, un oligonucleótido (por ejemplo, que comprende un análogo de nucleótido) y/o un agente de contraste (por ejemplo, un agente de contraste de metales pesados como el gadolinio)) para su uso en imagenología y/o terapia (por ejemplo, terapia para el cáncer de captura de neutrones). Ver, por ejemplo, Paunesku et al. *Nanomedicine* 4(3): 201-7, 2008.

En algunos casos, la tecnología encuentra uso como una etiqueta de administración de fármacos, por ejemplo, para la administración celular dirigida de oligonucleótidos y agentes terapéuticos antisentido (por ejemplo, ARNip, ARNm etc.). En algunos casos, la tecnología encuentra uso para la administración de fármacos enlazados a un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido, en donde el ácido nucleico sirve como una fracción de

5 direccionamiento. En algunos casos, la tecnología comprende el uso de una fracción dirigida a células para dirigir y/o administrar un oligonucleótido a una célula, tejido, órgano, etc. particular. La fracción dirigida a células imbuye compuestos (por ejemplo, un oligonucleótido (por ejemplo, análogo de oligonucleótido) de acuerdo con la tecnología descrita en la presente enlazada con una fracción de dirección de células/administración de fármaco, por ejemplo, como se describe a continuación) con características tales que los compuestos y/u oligonucleótidos se reconocen, unen, importan, procesan, activan, etc. por uno o más tipos de celdas objetivo con respecto a uno o más tipos de células no objetivo distintas. Por ejemplo, las células endoteliales tienen una alta afinidad por la fracción de péptido dirigido a Arg-Gly-Asp (RGD), las células cancerosas y renales interactúan preferentemente con compuestos que tienen una fracción de ácido fólico, las células inmunes tienen una afinidad por la manosa y los cardiomiocitos tienen una afinidad para el péptido CWLSEAGPWTVRALRGTGSW (ver, por ejemplo, Biomaterials 31:8081-8087, 2010). Otros fracciones de direccionamiento/administración son conocidos en la técnica. Por consiguiente, los compuestos que comprenden una fracción de direccionamiento interactúan preferentemente con y son aceptadas por el tipo de célula objetivos.

15 En algunos casos, los compuestos comprenden un péptido RGD. Los péptidos RGD comprenden de 4 a 30 (por ejemplo, de 5 a 20 o de 5 a 15) aminoácidos y células tumorales objetivo (por ejemplo, células tumorales endoteliales). Tales péptidos y agentes derivados de los mismos son conocidos en la técnica, y se describen por Beer et al. in *Methods Mol. Biol.* 680: 183-200 (2011) y en *Theranostics* 1: 48-57 (2011); por Morrison et al. en *Theranostics* 1: 149-153 (2011); por Zhou et al. en *Theranostics* 1: 58-82 (2011); y por Auzzas et al. en *Curr. Med. Chem.* 17: 1255-1299 (2010).

25 En algunos casos, la fracción dirigida es ácido fólico, por ejemplo, para dirigirse a células que expresan el receptor de folato. El receptor de folato se sobreexpresa en las superficies celulares de las células cancerosas humanas en, por ejemplo, cánceres de cerebro, riñón, pulmón, ovario y mama con respecto a niveles más bajos en las células normales (ver, por ejemplo, Sudimack J, et al. 2000 "Targeted drug delivery via the folate receptor" *Adv Drug Deliv Rev* 41: 147-162).

30 En algunos casos, la fracción de direccionamiento comprende transferrina, que dirige los compuestos a, por ejemplo, macrófagos, precursores eritroides en la médula ósea y células cancerosas. Cuando una proteína de transferrina encuentra un receptor de transferrina en la superficie de una célula, el receptor de transferrina se une a la transferrina y transporta la transferrina a la célula. Los fármacos y otros compuestos y/o fracciones enlazados a la transferrina también se transportan a la célula y, en algunos casos, se importan a las células. En algunos casos, un fragmento de una transferrina dirige los compuestos de la tecnología a la célula objetivo. Ver, por ejemplo, Qian et al. (2002) "Targeted drug delivery via the transferrin receptor- mediated endocytosis pathway", *Pharmacol. Rev.* 54: 561-87; Daniels et al. (2006) "The transferrin receptor part 1- Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer", *Clin. Immunol.* 121: 144-58.

40 En algunos casos, la fracción de direccionamiento comprende el péptido VHSPNKK. Este péptido dirige compuestos a las células que expresan la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), por ejemplo, a las células endoteliales activadas. Dirigirse a las células endoteliales activadas encuentra uso, por ejemplo, en la administración de agentes terapéuticos a las células para el tratamiento de la inflamación y el cáncer. Ciertas células de melanoma usan VCAM-1 para adherirse al endotelio y VCAM-1 participa en el reclutamiento de monocitos a sitios ateroscleróticos. Por consiguiente, el péptido VHSPNKK encuentra uso en dirigir compuestos de la presente tecnología a células cancerosas (por ejemplo, de melanoma) y sitios ateroscleróticos.

45 Ver, por ejemplo, Lochmann, et al. (2004) "Drug delivery of oligonucleotides by peptides" *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 237-251, que analiza fracciones dirigidas y las células objetivo de esas fracciones.

50 En algunos casos, la fracción de direccionamiento celular comprende un anticuerpo, o derivado o fragmento del mismo. Los anticuerpos para moléculas específicas de células como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, proteínas de superficie celular, proteínas de membrana, proteoglicanos, glicoproteínas, péptidos y similares); polinucleótidos (ácidos nucleicos, nucleótidos); lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, glicolípidos y similares), o fragmentos de los mismos que comprenden un epítipo o antígeno específicamente reconocido por el anticuerpo, compuestos objetivo de acuerdo con la tecnología para las células que expresan las moléculas específicas de la célula.

60 Por ejemplo, muchos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos se unen específicamente a marcadores producidos por o asociados con tumores o lesiones infecciosas, incluyendo infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias, y antígenos y productos asociados con tales microorganismos (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 3.927.193; 4.331.647; 4.348.376; 4.361.544; 4.468.457; 4.444.744; 4.460.459; 4.460.561; 4.818.709; y 4.624.846. Además, los anticuerpos que se dirigen a infartos de miocardio se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.036.945. Los anticuerpos que se dirigen a tejidos u órganos normales se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.735.210. Los anticuerpos anti-fibrina son conocidos en la técnica, al igual que los anticuerpos que se unen a la placa aterosclerótica y a los clones autorreactivos de

linfocitos.

Para el cáncer (por ejemplo, cáncer de mama) y sus metástasis, puede elegirse un marcador o marcadores específicos de los marcadores de la superficie celular como, por ejemplo, miembros de la familia de mucina de tipo MUC, un receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), un receptor carcinoembrionario. antígeno (CEA), un antígeno de carcinoma humano, un antígeno del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un gen del antígeno de melanoma (MAGE), antígeno familiar, un antígeno T/Tn, un receptor hormonal, receptores de factor de crecimiento, una antígeno de designación/diferenciación de grupo (CD), un gen supresor de tumores, un regulador del ciclo celular, un oncogén, un receptor de oncogenes, un marcador de proliferación, una molécula de adhesión, una proteinasa involucrada en la degradación de la matriz extracelular, un factor relacionado con la transformación maligna, un factor relacionado con la apoptosis, un antígeno de carcinoma humano, antígenos de glicoproteínas, antígenos de DF3, 4F2, MGFm, antígeno tumoral de mama CA 15-3, calponina, catepsina, antígeno CD 31, antígeno nuclear de células proliferativas 10 (PC 10) y pS2. Para otras formas de cáncer y sus metástasis, puede seleccionarse un marcador o marcadores específicos de los marcadores de la superficie celular como, por ejemplo, la familia del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), un miembro de la familia del antígeno carcinoembrionario (CEA), un tipo de mAB antridiotípico, un tipo de imitador de gangliósidos, un miembro de antígenos de diferenciación de designación de grupo, un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un tipo de molécula de adhesión celular, un miembro de la familia de mucina tipo MUC, un tipo de antígeno de cáncer (CA), un tipo de metaloproteinasa de la matriz, un tipo de antígeno de glicoproteína, un tipo de antígeno asociado a melanoma (MAA), una enzima proteolítica, una calmodulina, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), un tipo de marcador de angiogénesis, un antígeno de melanoma reconocido por el antígeno de células T (MART), un miembro de la familia del gen que codifica el antígeno de melanoma (MAGE), un antígeno específico de membrana prostática (PMSA), un antígeno de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLCA), un antígeno de T/Tn, un receptor de hormonas, un antígeno del gen supresor tumoral, un antígeno regulador del ciclo celular, un antígeno oncogénico, un antígeno del receptor oncogénico, un marcador de proliferación, una proteinasa involucrada en la degradación de la matriz extracelular, un factor relacionado con la transformación maligna, un factor relacionado con la apoptosis, y un tipo de antígeno de carcinoma humano.

El anticuerpo puede tener una afinidad por un objetivo asociado con una enfermedad del sistema inmune como, por ejemplo, una proteína, una citoquina, una quimiocina, un organismo infeccioso y similares. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con una afección transmitida por un patógeno. El objetivo particular y el anticuerpo pueden ser específicos, pero no estar limitados a, el tipo de afección transmitida por el patógeno. Un patógeno se define como cualquier agente productor de enfermedades como, por ejemplo, una bacteria, un virus, un microorganismo, un hongo, un prión y un parásito. El anticuerpo puede tener una afinidad por el patógeno o la materia asociada al patógeno. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con una afección transmitida por un patógeno. El marcador o marcadores pueden seleccionarse de tal manera que representen un objetivo viable en células infectadas. Para una afección transmitida por un patógeno, el anticuerpo puede seleccionarse para dirigirse al propio patógeno. Para una afección bacteriana, un objetivo predeterminado puede ser la propia bacteria, por ejemplo, *Escherichia coli* o *Bacillus anthracis*. Para una afección viral, un objetivo predeterminado puede ser el propio virus, por ejemplo, el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), un virus de la hepatitis, como el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH, el VIH- 1, o VIH-2, o un virus del herpes, como el virus del herpes 6. Para una afección parasitaria, un objetivo predeterminado puede ser el propio parásito, por ejemplo, *Trypanosoma cruzi*, Kinetoplastid, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* o *Schistosoma brucei*. Para una afección fúngica, un objetivo predeterminado puede ser el propio hongo, por ejemplo, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans* o *Rhizomucor*.

En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con un objetivo no deseable. El objetivo y el anticuerpo particulares pueden ser específicos, pero no están limitados a, el tipo del objetivo no deseable. Un objetivo no deseable es un objetivo que puede estar asociado con una enfermedad o una condición no deseada, pero que también está presente en la condición normal. Por ejemplo, el objetivo puede estar presente a concentraciones elevadas o estar alterado de otro modo en la enfermedad o en un estado no deseado. El anticuerpo puede tener una afinidad por el objetivo no deseable o por las vías moleculares biológicas relacionadas con el objetivo no deseable. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con el objetivo no deseable. Para un objetivo no deseable, La elección de un objetivo predeterminado puede ser importante para la terapia que utiliza los compuestos de acuerdo con la presente tecnología (por ejemplo, el fármaco y/o fracciones terapéuticas). El anticuerpo puede seleccionarse para dirigirse a la materia biológica asociada con una enfermedad o condición no deseable. Para la arteriosclerosis, un objetivo predeterminado puede ser, por ejemplo, la apolipoproteína B en lipoproteína de baja densidad (LDL). Para la obesidad, puede elegirse un marcador o marcadores predeterminados de los marcadores de la superficie celular como, por ejemplo, uno de receptor de polipéptido inhibidor gástrico y antígeno de CD36. Otro objetivo predeterminado no deseable puede ser la sangre coagulada. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con una reacción a un órgano trasplantado en el paciente. El objetivo y el anticuerpo particulares pueden ser específicos, pero no están limitados, para el tipo de trasplante de órganos. El anticuerpo puede tener una afinidad por una

molécula biológica asociada con una reacción a un trasplante de órgano. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con una reacción a un trasplante de órgano. El marcador o marcadores pueden seleccionarse de tal manera que representen un objetivo viable en células T o células B del sistema inmune. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con una toxina en el paciente. Una toxina se define como cualquier veneno producido por un organismo incluyendo, entre otros, toxinas bacterianas, toxinas vegetales, toxinas de insectos, toxinas animales y toxinas artificiales. El objetivo particular y el anticuerpo pueden ser específicos, pero no están limitados a, para el tipo de toxina. El anticuerpo puede tener una afinidad por la toxina o una molécula biológica asociada con una reacción a la toxina. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con una reacción a la toxina. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con una enfermedad relacionada con hormonas. El objetivo y el anticuerpo particulares pueden ser específicos, pero no están limitados a, para una enfermedad hormonal particular. El anticuerpo puede tener una afinidad por una hormona o una molécula biológica asociada con la vía hormonal. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con la enfermedad hormonal. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un objetivo predeterminado asociado con tejido enfermo no canceroso. El objetivo y el anticuerpo particulares pueden ser específicos, pero no están limitados a, un tejido enfermo no canceroso, como depósitos enfermos no cancerosos y depósitos precursores. El anticuerpo puede tener una afinidad por una molécula biológica asociada con el tejido enfermo no canceroso. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con el tejido enfermo no canceroso. En otra realización, el anticuerpo puede dirigirse a un patógeno proteínico. El objetivo y el anticuerpo particulares pueden ser específicos, pero no están limitados a, para un patógeno proteínico particular. El anticuerpo puede tener una afinidad por un patógeno proteínico o una molécula biológica asociada con el patógeno proteínico. El anticuerpo puede tener una afinidad por un marcador o marcadores celulares asociados con el patógeno proteínico. Para las enfermedades por priones, también conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles, un objetivo predeterminado puede ser, la proteína de prion 3F4.

Ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20050090732 (en particular la Tabla I) para una lista de objetivos, marcadores específicos de células (por ejemplo, antígenos para dirigir con una fracción de anticuerpo), anticuerpos e indicaciones asociadas con esos objetivos, marcadores específicos de células, y antígenos/anticuerpos.

En algunos casos, la tecnología encuentra uso en la imagenología, como para la hibridación in situ (ISH). En algunos casos, los análogos de nucleótidos proporcionados en la presente encuentran uso en ácidos nucleicos que son sondas de hibridación para ISH e hibridación fluorescente in situ (FISH). En algunos casos, los análogos de nucleótidos encuentran uso en ISH directo y/o para aplicaciones de inmunohistoquímica sin usar reactivos de detección secundarios.

7. Formulaciones farmacéuticas

En la presente se divulgan análogos de nucleótidos, oligonucleótidos que comprenden un análogo de nucleótidos, etc. en una formulación farmacéutica para la administración a un sujeto. En general, se contempla que los compuestos (por ejemplo, análogos de nucleótidos, oligonucleótidos que comprenden un análogo de nucleótido, conjugados de análogos de nucleótidos y/u oligonucleótidos que comprenden un análogo de nucleótido, etc.) relacionados con la tecnología se formulan para la administración a un mamífero, y especialmente a un humano con una condición que responde a la administración de tales compuestos. Por lo tanto, cuando los compuestos contemplados se administran en una composición farmacológica, se contempla que los compuestos contemplados se formulen mezclados con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los compuestos contemplados pueden administrarse por vía oral como sales farmacológicamente aceptables, o por vía intravenosa en una solución salina fisiológica (por ejemplo, tamponada a un pH de aproximadamente 7,2 a 7,5). Pueden usarse con este propósito tampones convencionales como fosfatos, bicarbonatos o citratos. Por supuesto, un experto en la técnica puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la especificación para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración particular. En particular, los compuestos contemplados pueden modificarse para hacerlos más solubles en agua u otro vehículo, lo que, por ejemplo, puede lograrse fácilmente con modificaciones menores (formulación de sal, esterificación, etc.) que están dentro de la habilidad ordinaria en la técnica. También está dentro de la habilidad ordinaria en la técnica modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto particular para gestionar la farmacocinética de los presentes compuestos para el efecto beneficioso máximo en un paciente.

En ciertas formas de dosificación farmacéutica, las formas de profármacos de los compuestos contemplados pueden formarse para varios propósitos, incluyendo la reducción de la toxicidad, aumentar la especificidad del órgano o célula objetivo, etc. Entre las varias formas de profármacos, se prefieren derivados acilados (acetilados u otros), ésteres de piridina y varias formas de sal de los presentes compuestos. Un experto en la técnica reconocerá cómo modificar los presentes compuestos a formas de profármacos para facilitar la administración de compuestos activos a un sitio objetivo dentro del organismo huésped o paciente. Un experto habitual en la técnica también aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas de profármaco, cuando corresponda, para administrar los presentes compuestos a un sitio objetivo dentro del organismo huésped o

paciente para maximizar el efecto pretendido del compuesto. De manera similar, debe apreciarse que los compuestos contemplados también pueden metabolizarse a su forma biológicamente activa y, por lo tanto, se contemplan específicamente todos los metabolitos de los compuestos de la presente. Además, los compuestos contemplados (y combinaciones de los mismos) pueden administrarse en combinación con otros agentes adicionales.

Con respecto a la administración a un sujeto, se contempla que los compuestos se administren en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Un experto en la técnica reconoce que una cantidad farmacéuticamente eficaz varía dependiendo del agente terapéutico usado, la edad, el estado y el sexo del sujeto, y la ampliación de la enfermedad en el sujeto. En general, la dosis no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. La dosificación también puede ajustarse por el médico o veterinario individual para lograr el objetivo terapéutico deseado.

Como se usa en la presente, la cantidad real abarcada por el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" dependerá de la vía de administración, el tipo de sujeto a tratar y las características físicas del sujeto específico en consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos por los profesionales expertos en técnicas de medicina, veterinaria y otras relacionadas. Esta cantidad y el método de administración pueden adaptarse para maximizar la eficacia, pero dependerán de factores como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente uno o más compuestos de la presente tecnología asociados con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, como los descritos en, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

Por consiguiente, en algunos casos, el agente inmunoterapéutico se formula como un comprimido, una cápsula, un comprimido de liberación en el tiempo, una cápsula de liberación en el tiempo; un sedimento de liberación en el tiempo; un comprimido de liberación lenta, una cápsula de liberación lenta; un sedimento de liberación lenta; un comprimido de liberación rápida, una cápsula de liberación rápida; un sedimento de liberación rápida; un comprimido sublingual; una cápsula de gel; una microencapsulación; una formulación de administración transdérmica; un gel transdérmico; un parche transdérmico; una solución estéril; una solución estéril preparada para usar como una inyección intramuscular o subcutánea, para usar como inyección directa en un sitio objetivo, o para administración intravenosa; una solución preparada para administración rectal; una solución preparada para la administración a través de una sonda de alimentación gástrica o una sonda de alimentación duodenal; un supositorio para administración rectal; un líquido para consumo oral preparado como una solución o un elixir; una crema tópica; un gel; una loción; una tintura; un jarabe; una emulsión; o una suspensión.

En algunos casos, la formulación de liberación en el tiempo es un mecanismo de liberación sostenida, acción sostenida, liberación prolongada, liberación controlada, liberación modificada o liberación continua, por ejemplo, la composición está formulada para disolverse rápida, lentamente o a cualquier velocidad de liberación apropiada del compuesto a lo largo del tiempo.

En algunos casos, las composiciones se formulan de manera que el ingrediente activo esté incorporado en una matriz de una sustancia insoluble (por ejemplo, varios acrílicos, quitina) de tal manera que el compuesto de disolución se abra paso a través de los agujeros en la matriz, por ejemplo, por difusión. En algunos casos, la formulación está encerrada en un comprimido a base de polímero con un orificio perforado con láser en un lado y una membrana porosa en el otro lado. Los ácidos del estómago empujan a través de la membrana porosa, empujando de este modo el medicamento a través del orificio perforado con láser. Con el tiempo, la dosis completa del fármaco se libera en el sistema mientras el recipiente de polímero permanece intacto, para ser excretado más tarde a través de la digestión normal. En algunas formulaciones de liberación sostenida, el compuesto se disuelve en la matriz y la matriz se hincha físicamente para formar un gel, permitiendo que el compuesto salga a través de la superficie exterior del gel. En algunos casos, las formulaciones están en una forma microencapsulada, por ejemplo, que se usa en algunos casos para producir un perfil de disolución complejo. Por ejemplo, recubriendo el compuesto alrededor de un núcleo inerte y estratificándolo con sustancias insolubles para formar una microesfera, algunos casos proporcionan velocidades de disolución más consistentes y replicables en un formato conveniente que se combina en casos particulares con otros ingredientes farmacéuticos de liberación controlada (por ejemplo, instantánea), por ejemplo, para proporcionar una cápsula de gel multiparte.

En algunos casos, las preparaciones farmacéuticas y/o formulaciones de la tecnología se proporcionan en partículas. "Partículas" como se usa en la presente en un contexto farmacéutico significa nano- o micropartículas (o en algunos casos más grandes) que pueden consistir en todo o en parte de los compuestos como se describe en la presente. Las partículas pueden contener las preparaciones y/o formulaciones en un núcleo rodeado por un recubrimiento, incluyendo, pero no limitado a, un recubrimiento entérico. Las preparaciones y/o formulaciones también pueden dispersarse a través de las partículas. Las preparaciones y/o formulaciones también pueden

adsorberse en las partículas. Las partículas pueden ser de cualquier cinética de orden de liberación, incluyendo la liberación de orden cero, la liberación de primer orden, la liberación de segundo orden, la liberación retardada, la liberación sostenida, la liberación inmediata y cualquier combinación de las mismas, etc. La partícula puede incluir, además de las preparaciones y/o formulaciones, cualquiera de esos materiales usados de manera rutinaria en la técnica de la farmacia y la medicina, incluyendo, pero no limitado a, materiales erosionables, no erosionables, biodegradables o no biodegradables, o combinaciones de los mismos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la formulación en una solución o en un estado semisólido. Las partículas pueden tener prácticamente cualquier forma.

Tanto los materiales poliméricos no biodegradables como los biodegradables pueden usarse en la fabricación de partículas para administrar las preparaciones y/o formulaciones. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en base al período de tiempo durante el cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen los hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26: 581-587. Estos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhidridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

La tecnología también proporciona métodos para preparar preparaciones farmacéuticas estables que contienen soluciones acuosas de los compuestos o sales de los mismos para inhibir la formación de productos de la degradación. Se proporciona una solución que contiene el compuesto o sales del mismo y por lo menos un agente inhibidor. La solución se procesa con por lo menos una técnica de esterilización antes y/o después del llenado terminal de la solución en el recipiente sellable para formar una preparación farmacéutica estable. Las presentes formulaciones pueden prepararse mediante varios métodos conocidos en la técnica siempre que la formulación sea sustancialmente homogénea, por ejemplo, el producto farmacéutico se distribuya de manera sustancialmente uniforme dentro de la formulación. Tal distribución uniforme facilita el control sobre la liberación del fármaco desde la formulación.

En algunos casos, el compuesto se formula con un agente de tamponamiento. El agente de tamponamiento puede ser cualquier agente de tamponamiento farmacéuticamente aceptable. Los sistemas de tampones incluyen tampones de citrato, tampones de acetato, tampones de borato y tampones de fosfato. Los ejemplos de tampones incluyen ácido cítrico, citrato de sodio, acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio y ácido fosfórico, ascorbato de sodio, ácido tartárico, ácido maleico, glicina, lactato de sodio, ácido láctico, ácido ascórbico, imidazol, bicarbonato de sodio y ácido carbónico, succinato de sodio y ácido succínico, histidina y benzoato de sodio y ácido benzoico.

En algunos casos, el compuesto se formula con un agente quelante. El agente quelante puede ser cualquier agente quelante farmacéuticamente aceptable. Los agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (también sinónimo de EDTA, ácido edético, ácido de versnoo y sequestreno) y derivados de EDTA como edetato dipotásico, edetato disódico, edetato disódico cálcico, edetato sódico, edetato trisódico y edetato potásico. Otros agentes quelantes incluyen ácido cítrico y derivados del mismo. El ácido cítrico también se conoce como monohidrato de ácido cítrico. Los derivados del ácido cítrico incluyen ácido cítrico anhidro y dihidrato de citrato trisódico. Otros agentes quelantes más incluyen niacinamida y derivados de la misma y desoxicolato de sodio y derivados del mismo.

En algunos casos, el compuesto se formula con un antioxidante. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los antioxidantes son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales como ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico (por ejemplo, ascorbilpalmitato, ascorbilstearato, ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, etc.), hidroxil anisol butilado, hidroxil tolueno buyilado, alquilgallato, metabisulfato de sodio, bisulfato de sodio, ditionito de sodio, ácido tioglicólico de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, tocoferol y derivados de los mismos (d-alfa tocoferol, d-alfa tocoferol acetato, dl-alfa tocoferol acetato, d-alfa tocoferol succinato, beta tocoferol, delta tocoferol, gamma tocoferol y d-alfa tocoferol polioxietilenglicol 1000 succinato) monotioglicerol y sulfito de sodio. Tales materiales se añaden típicamente en intervalos del 0,01 al 2,0%.

En algunos casos, el compuesto se formula con un crioprotector. El agente crioprotector puede ser cualquier agente crioprotector farmacéuticamente aceptable. Los agentes crioprotectores comunes incluyen histidina, polietilenglicol, polivinilpirrolidina, lactosa, sacarosa, manitol y polioles.

En algunos casos, el compuesto se formula con un agente de isotonicidad. El agente de isotonicidad puede ser cualquier agente de isotonicidad farmacéuticamente aceptable. Este término se usa en la técnica de manera intercambiable con un agente isoosmótico, y se conoce como un compuesto que se añade a la preparación farmacéutica para aumentar la presión osmótica, por ejemplo, en algunos casos a la de la solución de cloruro de sodio al 0,9%, que es iso-osmótica con fluidos extracelulares humanos, como el plasma. Los agentes de isotonicidad

preferidos son cloruro de sodio, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa y glicerol.

La preparación farmacéutica puede comprender opcionalmente un conservante. Los conservantes comunes incluyen los seleccionados del grupo que consiste de clorobutanol, parabenes, timerosal, alcohol bencílico y fenol. Los conservantes adecuados incluyen, pero no están limitados a: clorobutanol (0,3-0,9% p/v), parabenes (0,01-5,0%), timerosal (0,004-0,2%), alcohol bencílico (0,5-5%), fenol (0,1-1,0 %), y similares.

En algunos casos, el compuesto se formula con un humectante para proporcionar una sensación agradable en la boca en aplicaciones orales. Los humectantes conocidos en la técnica incluyen colesterol, ácidos grasos, glicerina, ácido láurico, estearato de magnesio, pentaeritritol y propilenglicol.

En algunos casos, se incluye un agente emulsionante en las formulaciones, por ejemplo, para asegurar la disolución completa de todos los excipientes, especialmente los componentes hidrófobos como el alcohol bencílico. Muchos emulsionantes son conocidos en la técnica, por ejemplo, polisorbato 60.

Para algunos casos relacionados con la administración oral, puede ser deseable añadir un agente aromatizante y/o edulcorante farmacéuticamente aceptables. Los compuestos como la sacarina, la glicerina, el jarabe simple y el sorbitol son útiles como edulcorantes.

8. Administración, tratamientos y dosificación

También se divulgan en la presente métodos para proporcionar una dosificación de un análogo de nucleótido, un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido o un conjugado del mismo (por ejemplo, que comprende una fracción de direccionamiento, agente de contraste, marcador, etiqueta, etc.) a un sujeto. En algunos casos, un compuesto, un derivado del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. En algunos casos, un compuesto, un derivado del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una dosis terapéuticamente eficaz.

La cantidad y frecuencia de dosificación se seleccionan para crear un nivel efectivo del compuesto sin efectos sustancialmente nocivos. Cuando se administra por vía oral o intravenosa, la dosificación del compuesto o compuestos relacionados generalmente variará entre de 0,001 y 10.000 mg/kg/día o dosis (por ejemplo, 0,01 a 1000 mg/kg/día o dosis; 0,1 a 100 mg/kg/día o dosis).

Los métodos para administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz incluyen, sin limitación, la administración en forma parenteral, oral, intraperitoneal, intranasal, tópica, sublingual, rectal y vaginal. Las vías de administración parenteral incluyen, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal y vías de infusión. En algunos casos, el compuesto, un derivado del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía oral.

En algunos casos, se administra una dosis individual de un compuesto o un compuesto relacionado a un sujeto. En otras realizaciones, se administran múltiples dosis durante dos o más puntos temporal, separadas por horas, días, semanas, etc. En algunos casos, los compuestos se administran durante un largo período de tiempo (por ejemplo, crónicamente), por ejemplo, durante un período de meses o años (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses o años). En tales casos, los compuestos pueden tomarse en base a un programa regularmente (por ejemplo, diariamente, semanalmente, etc.) durante el período extendido.

La tecnología también se refiere a los métodos de tratamiento de un sujeto con un fármaco apropiado para la dolencia del sujeto. de acuerdo con otro aspecto de la tecnología, se proporciona un método para tratar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento con una cantidad eficaz de un compuesto o una sal del mismo. El método implica administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o una sal del mismo en cualquiera de las preparaciones farmacéuticas descritas anteriormente, detalladas en la presente, y/o expuestas en las reivindicaciones. El sujeto puede ser cualquier sujeto con necesidad de dicho tratamiento. En la descripción anterior, la tecnología está relacionada con un compuesto o sales del mismo. Tales sales incluyen, pero no están limitadas a, sales de bromuro, sales de cloruro, sales de yoduro, sales de carbonato y sales de sulfato. Sin embargo, debe entenderse que el compuesto es un miembro de una clase de compuestos y que se pretende que la tecnología abarque preparaciones farmacéuticas, métodos y kits que contienen derivados relacionados dentro de esta clase. Otro aspecto de la tecnología abarca entonces el resumen anterior, pero leyéndose en cada aspecto como si cualquiera de tales derivados fuera sustituido donde aparece "compuesto".

En algunos casos, se prueba a un sujeto para evaluar la presencia, la ausencia o el nivel de una dolencia y/o una afección. Dicha prueba se realiza, por ejemplo, analizando o midiendo un biomarcador, un metabolito, un síntoma físico, una indicación, etc., para determinar el riesgo o la presencia de la dolencia o afección. En algunos casos, al sujeto se le trata con un compuesto basado en el resultado de la prueba. En algunos casos, se trata a un sujeto, se obtiene una muestra y se mide el nivel de agente detectable, y luego se vuelve a tratar al sujeto en base al nivel de agente detectable que se midió. En algunos casos, se trata a un sujeto, se obtiene una muestra y se mide el

nivel de agente detectable, se vuelve a tratar al sujeto en base al nivel de agente detectable que se midió, y luego se obtiene otra muestra y se mide el nivel de agente detectable. En algunos casos, otras pruebas (por ejemplo, no basadas en la medición del nivel de agente detectable) también se usan en varias etapas, por ejemplo, antes del tratamiento inicial como guía para la dosis inicial. En algunos casos, un tratamiento posterior se ajusta en base a un resultado de la prueba, por ejemplo, se cambia la cantidad de dosificación, el programa de dosificación, la identidad del fármaco, etc. En algunos casos, un paciente se prueba, se trata y luego se prueba de nuevo para monitorizar la respuesta a la terapia y/o cambiar la terapia. En algunos casos, los ciclos de prueba y tratamiento pueden producirse sin limitación al patrón de prueba y tratamiento, la periodicidad o la duración del intervalo entre cada fase de prueba y de tratamiento. Como tal, la tecnología contempla varias combinaciones de prueba y tratamiento sin limitación, por ejemplo, prueba/tratamiento, tratamiento/prueba, prueba/tratamiento/prueba, tratamiento/prueba/tratamiento, prueba/tratamiento/prueba/tratamiento, prueba/tratamiento/prueba/tratamiento/prueba, prueba/tratamiento/prueba/prueba/tratamiento/tratamiento/tratamiento/prueba, tratamiento/tratamiento/prueba/tratamiento, prueba/tratamiento/tratamiento/prueba/tratamiento/tratamiento, etc.

Aunque la divulgación en la presente se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, debe entenderse que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Caracterización de análogos de nucleótidos

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, los análogos de nucleótidos se caracterizaron por métodos químicos analíticos. En particular, se sintetizaron 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, 3'-O-propargil-dGTP, y 3'-O-propargil-dTTP de acuerdo con los esquemas sintéticos descritos en la presente y caracterizados por ¹H NMR, ³¹P NMR, HPLC de intercambio aniónico y espectrometría de masas de alta resolución. Las pruebas analíticas indicaron que la síntesis y la purificación tuvieron éxito (Figuras X-Y).

Ejemplo 2 - Ensayos para identificar polimerasas compatibles

En algunos casos, la tecnología está relacionada con la incorporación de análogos de nucleótidos en un ácido nucleico. Por consiguiente, en la presente se divulgan ensayos para identificar polimerasas que reconocen análogos de nucleótidos (por ejemplo, 3'-O-propargil-dNTP) como sustratos. Por ejemplo, en algunos ensayos ejemplares, las polimerasas compatibles se identifican mediante una reacción de ampliación de polimerasa (por ejemplo, una reacción de ampliación de base única). Ver, por ejemplo, Ausebel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: John Wiley & Sons, Inci Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2ª ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Por ejemplo, la identificación de polimerasas compatibles comprende proporcionar una polimerasa para analizar y un tampón de reacción apropiado para la polimerasa. Para polimerasas obtenidas de un proveedor comercial (por ejemplo, New England BioLabs, United States Biologicals, Promega, Invitrogen, Worthington, Sigma-Aldrich, Fluka, Finnzymes, Roche, 5 Prime, Qiagen, KAPA Biosystems, Thermo Scientific, Agilent, Life Technologies, etc.), la polimerasa a menudo se suministra con un tampón de reacción apropiado. Un tampón de reacción ejemplar comprende, por ejemplo, un tampón compatible (por ejemplo, Tris-HCl 20 mM), una sal (por ejemplo, KCl 10 mM), una fuente de magnesio o manganeso (por ejemplo, MgSO₄ 2 mM; MnCl₂ 2 mM, etc.), un detergente (por ejemplo, 0,1% de TRITON X-100) y tiene un pH adecuado (por ejemplo, aproximadamente pH 8.8 a aproximadamente 25° C). Las actividades de algunas polimerasas se mejoran en presencia de otros compuestos, como el sulfato y otras sales (por ejemplo, (NH₄)₂SO₄) 10 mM. Las mezclas de reacción para las reacciones de ampliación de la polimerasa se prueban típicamente usando Mg²⁺ o Mn²⁺ como cofactor enzimático.

Las polimerasas se prueban proporcionando en la mezcla de la reacción una plantilla de ADN, un cebador de ADN que es complementario a la plantilla de ADN y uno o más nucleótidos y/o análogos de nucleótidos. Las concentraciones típicas de plantilla y cebador son aproximadamente de 1 a 100 nM y las concentraciones típicas de nucleótidos y/o análogos de nucleótidos son aproximadamente de 1 a 125 μM (por ejemplo, de 1 a 125 μM para cada nucleótido y/o análogo de nucleótido y/o 1 a 500 μM de concentración total de todos los nucleótidos y/o análogos de nucleótidos). Las plantillas y los cebadores se sintetizan mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando soportes sólidos y química de fosforamidita) y están disponibles de varios proveedores comerciales (por ejemplo, Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa).

Un cebador/plantilla previamente apareado se produce típicamente para probar polimerasas. Por ejemplo, el cebador se resuspende típicamente en un tampón adecuado (por ejemplo, Tris-EDTA, pH 8,0) a una concentración adecuada, por ejemplo, de 1 a 500 μM (por ejemplo, a 100 μM) y la plantilla se resuspende típicamente en un tampón adecuado (por ejemplo, Tris-EDTA, pH 8,0) a una concentración adecuada, por ejemplo, de 1 a 500 μM (por ejemplo, a 100 μM). Luego, se produce un cebador/plantilla previamente apareado mezclando cantidades aproximadamente iguales del cebador y la plantilla en un tampón de apareamiento. Por ejemplo, un cebador/plantilla previamente apareado se produce mezclando aproximadamente 100 μl de la solución de cebador

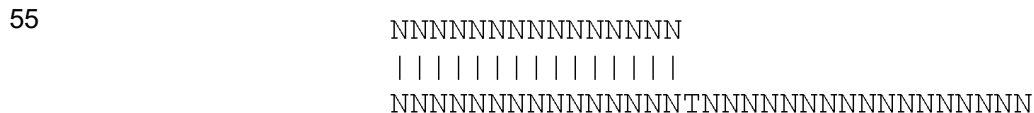
de aproximadamente 1 a 500 μ M (por ejemplo, a 100 μ M) a aproximadamente 100 μ l de aproximadamente 1 a 500 μ M (por ejemplo, a 100 μ M) solución de plantilla en aproximadamente 800 μ l de un tampón de apareamiento (por ejemplo, Tris 200 mM, cloruro de potasio 100 mM y EDTA 0,1 mM, pH 8,45) para proporcionar un mililitro de solución de cebador/plantilla. Un experto en la técnica puede escalar los volúmenes y concentraciones como sea apropiado para las concentraciones y volúmenes que son apropiados para el análisis particular. Luego, una alícuota (por ejemplo, 100 μ l) de la solución de cebador/plantilla se calienta para desnaturalizar las estructuras secundarias intramoleculares y/o intermoleculares (por ejemplo, calentando a aproximadamente 85° C a 97° C (por ejemplo, a aproximadamente a 95° C), por ejemplo, de 1 a 5 minutos (por ejemplo, 2 minutos). Luego, la alícuota se enfría a una temperatura de apareamiento (por ejemplo, 20° C a 60° C (por ejemplo, 25° C) y se incuba durante de 1 a 10 minutos (por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos) para permitir que el cebador y la plantilla se apareen para formar un cebador/plantilla. El cebador/plantilla puede diluirse en un tampón de dilución de sustrato apropiado (por ejemplo Tris 20mM, cloruro de potasio 10 mM, y EDTA 0,01 mM, pH 8,45; por ejemplo, una dilución de 1 a 10 del tampón de apareamiento descrito anteriormente) para el almacenamiento. Por ejemplo, el cebador/plantilla puede diluirse a una concentración final de 0,01 μ M (por ejemplo, para proporcionar una solución 10x) en el tampón de dilución de sustrato, dividirse en alícuotas, y almacenarse a -20° C.

En la técnica se conocen paquetes de software que proporcionan asistencia en el diseño de plantillas y cebadores para estos ensayos. Además, están disponibles varias ecuaciones para calcular la desnaturalización (por ejemplo, temperaturas de fusión (T_m)) y temperaturas de apareamiento. Las referencias estándar describen una estimación simple del valor de T_m que puede calcularse mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 * (\% G+C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M (ver, por ejemplo, Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985). Otras referencias (por ejemplo., Allawi yd SantaLucia, Biochemistry 36: 10581-94 (1997) incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta las características estructurales, ambientales y de secuencia.

El cebador y la plantilla o plantilla previamente apareada se usan para probar la polimerasa. Por ejemplo, los ensayos de ampliación del cebador se realizan con de 1 a 100 nM (por ejemplo, 50 nM) del cebador/plantilla, dNTP (por ejemplo, una mezcla de 1 a 125 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dATP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dATP), dCTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dCTP), dGTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dGTP), y/o dTTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil- dTTP)) y polimerasa (por ejemplo, de 1 a 100 U de polimerasa termoestable/termofílica o polimerasa mesofílica) en un volumen final de aproximadamente 1 a 100 μ l (por ejemplo, de 10 a 20 μ l) que contiene un tampón apropiado (por ejemplo, como se proporciona por el proveedor comercial de la polimerasa o el tampón de reacción ejemplar como se ha descrito anteriormente). En algunos ensayos, la mezcla de la reacción comprende de 1 a 50 U (por ejemplo, 1 U) de pirofosfatasa termoestable.

En algunos ensayos, se usa una mezcla de dNTP y dNTP modificados. Por ejemplo, algunos ensayos prueban la incorporación de una base individual en un ácido nucleico (por ejemplo, en un ensayo de ampliación de base individual). En dicho ensayo, el cebador hibrida con una región complementaria en la plantilla para formar un dúplex de tal manera modo que el extremo 3' terminal del cebador está directamente adyacente con el compañero de apareamiento de bases del análogo de nucleótido a probar. En una prueba exitosa, la polimerasa candidata que se está probando incorpora un único análogo de nucleótido en el extremo 3' del cebador. Hay muchos enfoques disponibles para detectar la incorporación del análogo de nucleótido, incluido el marcado de fluorescencia, el marcado de masas para espectrometría de masas, la medición de la actividad enzimática usando una fracción de proteína y el marcado de isótopos.

En particular, el ensayo prueba la incorporación de un nucleótido modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dNTP) al extremo 3' del cebador como lo indica la plantilla. En dicho ensayo, la mezcla de reacción puede contener tres dNTP y un dNTP modificado particular que se añade al extremo 3' del cebador como lo indica la plantilla. Algunos ensayos comprenden el uso de cuatro mezclas de reacción individuales que comprenden cada uno de los cuatro cebadores apareados a una plantilla (por ejemplo, cuatro cebadores/plantillas) diseñados de tal manera que cada uno de los cuatro nucleótidos modificados se añade al extremo 3' del cebador como lo indica la plantilla. Por ejemplo, en algunos casos se proporciona un cebador/plantilla para probar la incorporación de un dATP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dATP):



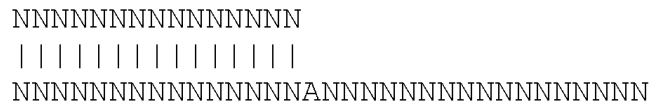
en el que N es cualquier nucleótido y "|" indica un apareamiento de bases complementario entre el cebador ejemplar (cadena superior) y la plantilla ejemplar (cadena inferior). En algunos casos, se proporciona un cebador/plantilla para probar la incorporación de un dCTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dCTP):



5 en el que N es cualquier nucleótido y "|" indica un apareamiento de bases complementario entre el cebador ejemplar (cadena superior) y la plantilla ejemplar (cadena inferior). En algunos casos, se proporciona un cebador/plantilla para probar la incorporación de un dGTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dGTP):



10
15 en el que N es cualquier nucleótido y "|" indica un apareamiento de bases complementario entre el cebador ejemplar (cadena superior) y la plantilla ejemplar (cadena inferior). En algunos casos, se proporciona un cebador/plantilla para probar la incorporación de un dTTP modificado (por ejemplo, 3'-O-propargil-dTTP):



20
25 en el que N es cualquier nucleótido y "|" indica un apareamiento de bases complementario entre el cebador ejemplar (cadena superior) y la plantilla ejemplar (cadena inferior). Los cebadores y las plantillas pueden tener cualquier longitud apropiada para el ensayo y la posición de la ampliación de base individual puede ser dirigida por cualquier nucleótido apropiado de la plantilla, habitualmente dentro de la porción central de la plantilla.

30 La polimerasa se prueba en la mezcla de reacción a una temperatura apropiada para la polimerasa. Por ejemplo, una polimerasa mesófila se prueba a una temperatura de 20° C a 60° C y una polimerasa termófila se prueba a una temperatura de 80° C a 97° C o más (por ejemplo, 100° C o más). Las temperaturas apropiadas se indican en la bibliografía que acompaña a las polimerasas suministradas comercialmente; un experto en la técnica puede determinar las temperaturas apropiadas para otra (por ejemplo, cualquier) polimerasa probando la actividad de la polimerasa con nucleótidos estándar en un intervalo de temperaturas.

35 En algunos ensayos, la temperatura se cicla entre una temperatura para desnaturalizar los ácidos nucleicos (por ejemplo, una temperatura de fusión) de aproximadamente 85° C a 97° C (por ejemplo, a aproximadamente 95° C) durante 1 a 5 minutos (por ejemplo, 2 minutos), una temperatura de apareamiento de aproximadamente 40° C a 70° C (por ejemplo, a 55° C) durante 5 a 60 segundos (por ejemplo, 15 a 20 segundos), y una temperatura de ampliación de aproximadamente 60 a 75° C (por ejemplo, de 70 a 75° C) durante de 15 a 60 segundos (por ejemplo, de 20 a 45 segundos), por ejemplo, durante 20 a 50 ciclos.

40 La incorporación exitosa de un nucleótido modificado (por ejemplo, Un 3'-O-propargil dNTP) se determina por cualquier número de métodos. En algunos ensayos particulares, el tamaño del producto de reacción se cuantifica para determinar si se añadió al cebador el nucleótido modificado (por ejemplo, un 3'-O-propargil dNTP). En particular, el producto de una incorporación exitosa es un par de bases más largo que la longitud conocida del cebador. El cebador puede analizarse como una muestra de control negativo para comparación. Además, puede evaluarse un oligonucleótido de control positivo sintético que tiene la longitud y estructura de un producto de reacción esperado de una incorporación con éxito. Cualquier método para discriminar entre ácidos nucleicos que difieren en una base es apropiado para el ensayo, por ejemplo, electroforesis en gel (por ejemplo, Agilent Bioanalyzer), espectrometría de masas, HPLC, etc.

Ejemplo 3 - detección de polimerasa

55 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para identificar polimerasas que pueden incorporar eficientemente 3'-O-propargil-dNTP como sustratos. En particular, los casos de los ensayos de ampliación de nucleótidos ejemplares descritos en el Ejemplo 2 se usaron para probar múltiples enzimas polimerasas, incluyendo las vendidas con los nombres comerciales Ampli-Taq (Life Technologies), KAPA HiFi (KAPA Biosystems), KAPA 2G (KAPA Biosystems), ADN polimerasa Herculase II Fusion (Agilent), ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS (Agilent), ADN polimerasa Phire HS II (Thermo Scientific), transcriptasa inversa M-MuLV (NEB), ADN polimerasa rTth, ADN polimerasa 9°N (NEB), ADN polimerasa THERMINATOR I (NEB), ADN polimerasa THERMINATOR II (NEB) y 5 polimerasas adicionales personalizadas fuera de catálogo de NEB. Se siguieron las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores comerciales para todas las polimerasas probadas. Las pruebas de cada polimerasa se realizaron usando Mg²⁺ y Mn²⁺ como cofactor en la mezcla de reacción.

Los datos recopilados indicaron que las polimerasas derivadas de *Thermococcus* sp. (por ejemplo, *Thermococcus* sp. 9°N (por ejemplo, TERMINATOR I y THERMINATOR II)) incorporaron los 3'-O-propargil dNTP proporcionados en la presente en un ácido nucleico (Tabla 1).

Tabla 1 - Resumen de la detección de polimerasa

co-factor	Amplitaq Gold	KAPA HiFI	KAPA 2G	Herculase II Fusion	Pgu Ultra II Fusion	Phire HS II	M-MuLV	rTth	9°N
Mg ²⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn ²⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	+

co-factor	Therminator I	Therminator II	NEB 1	NEB 2	NEB 3	NEB 4	NEB 5
Mg ²⁺	-	+	-	-	-	-	-
Mn ²⁺	-	+++	-	-	-	-	-

En la Tabla 1, un signo menos ("-") indica que la polimerasa no produjo un producto detectable que incorpora el 3'-O-propargil dNTP, un signo más ("+") indica que la polimerasa produjo un producto detectable que incorpora el 3'-O-propargil dNTP, y tres masas ("+++") indican que la polimerasa produjo una cantidad sustancial de producto de incorporación de 3'-O-propargil dNTP. NEB1, NEB2, NEB3, NEB4 y NEB5 indican cada una de las cinco polimerasas no comerciales de New England BioLabs probadas.

Debe entenderse que los ensayos (por ejemplo, Como se describe en la presente, como se describe en otro lugar y como se conoce en la técnica) están disponibles para identificar cualquier polimerasa que incorpore nucleótidos modificados (por ejemplo, Los 3'-O-propargil dNTP proporcionados en la presente) en un ácido nucleico. Por consiguiente, la tecnología no está limitada por el uso de polimerasas de *Thermococcus* sp. 9°N (THERMINATOR I y THERMINATOR II) y contempla el uso de cualquier polimerasa existente o aún por descubrir que incorpore los nucleótidos modificados (por ejemplo, los 3'-O-propargil dNTP proporcionados en la presente) en un ácido nucleico. Los experimentos descritos en la presente usando polimerasas de *Thermococcus* sp. 9°N (THERMINATOR II) son ejemplares y no limitan la tecnología al uso de ninguna polimerasa en particular.

Ejemplo 4 - Incorporación de 3'-O-propargil-dNTP en un ácido nucleico

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para evaluar la incorporación de 3'-O-propargil-dNTP en un ácido nucleico por una polimerasa. En particular, se realizaron experimentos para evaluar la incorporación precisa de 3'-O-propargil-dNTP en un ácido nucleico y para evaluar la actividad de terminación de los 3'-O-propargil-dNTP. Para evaluar estas características de los análogos de nucleótidos proporcionados en la presente, se realizaron ensayos de ampliación de polimerasa usando un ácido nucleico plantilla que tiene una secuencia de KRAS humano (por ejemplo, Secuencias de intrón de flanqueo y exón 2 de KRAS) y un cebador complementario (Tabla 2).

Tabla 2 - secuencias de plantilla y cebador usadas para evaluar la incorporación de 3'-O-propargil-dNTP

Nombre	Secuencia (5' a 3')	longitud (bases)	SEQ ID NO:
plantilla KRAS	TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTA ATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT CCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATA TGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCT	177	1
R_ke2-trP1_T-bio	bTAAUCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAG AATGGTCCTGCACCAGTAA	48	2
R_ke2-trP1_A-bio	bTAAUCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAG AATGGTCCTGCACCAGTAAT	49	3
R_ke2-trP1_G-bio	bTAAUCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAG AATGGTCCTGCACCAGTAATAT	51	4
R_ke2-trP1_C-bio	bTAAUCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAG AATGGTCCTGCACCAGTAATATG	52	5

En la Tabla 2, una "b" indica una modificación de biotina y una "U" indica una modificación de desoxiuridina. La incorporación de los cebadores en productos de ampliación produce productos de ampliación que comprenden un uracilo. El uracilo es útil, por ejemplo, para la escisión del producto (por ejemplo, usando reactivos de escisión de uracilo) en una serie de manipulaciones biológicas moleculares (por ejemplo, escisión del producto de un soporte sólido).

Para probar la incorporación de un 3'-O-propargil-dTTP en un ácido nucleico, se ensambló una mezcla de reacción de ampliación de polimerasa que comprendía Tris-HCl 20 mM, (NH₄)SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MnCl₂ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, 200 pmol de 3'-O-propargil-dTTP, 6,25 pmol de cebador R_ke2_trP1_T_bio (SEQ ID NO: 2) y 2 unidades de ADN polimerasa Therminator II (New England BioLabs) en un volumen de reacción final de 25 µl. Se usó un volumen de 0,5 pmol de la plantilla KRAS (SEQ ID NO: 1) como plantilla (Tabla 2). La reacción de ampliación de polimerasa se realizó usando un perfil de ciclos de temperatura que comprende exponer la reacción a una temperatura de 95° C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos de 95° C durante 15 segundos, 55° C durante 25 segundos y 65° C durante 35 segundos.

Después de la reacción de ampliación de polimerasa, se usó 1 µl de la mezcla de reacción directamente para el análisis del tamaño de ácido nucleico por electroforesis en gel (por ejemplo, usando un bioanализador Agilent 2100 y un chip de ensayo de ADN de alta sensibilidad). Los datos recopilados del análisis de tamaño mostraron la presencia de una población de ácidos nucleicos que tenía una longitud correspondiente a la longitud del cebador usado en la reacción (por ejemplo, 48 bases) y una población de ácidos nucleicos que tenía una longitud correspondiente a la longitud del cebador más una base (por ejemplo, 49 bases). Por consiguiente, los datos recopilados indicaron la incorporación exitosa del 3'-O-propargil-dTTP en el extremo 3' del cebador. Además, las cantidades de las dos poblaciones de ácidos nucleicos fueron aproximadamente iguales, lo que indica la incorporación robusta del 3'-O-propargil-dTTP en el extremo 3' del cebador para formar el producto de la ampliación.

Se realizaron experimentos adicionales de ampliación de polimerasa usando las condiciones de reacción descritas anteriormente y reemplazando el 3'-O-propargil-dTTP y el cebador R_ke2_trP1_T_bio con 3'-O-propargil-dATP y el cebador R_ke2_trP1_A_bio (SEQ ID NO: 3); 3'-O-propargil-dCTP y el cebador R_ke2_trP1_C_bio (SEQ ID NO: 5); y 3'-O-propargil-dGTP y el cebador R_ke2_trP1_G_bio (SEQ ID NO: 4). Los datos recopilados de estos experimentos indicaron de manera similar la incorporación exitosa de 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP y 3'-O-propargil-dGTP, respectivamente, en el extremo 3' de los cebadores.

Ejemplo 5 - generación de fragmentos de escalera

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para evaluar el uso de los análogos de nucleótidos de la presente tecnología para generar fragmentos de ácidos nucleicos que terminan en posiciones específicas de la base. En particular, se produjeron y ensayaron mezclas de reacción que incluían tanto dNTP naturales como cada uno de los 3'-O-propargil-dNTP individualmente.

Para probar la generación de fragmentos por 3'-O-propargil-dTTP, se preparó una mezcla de reacción de

generación de fragmentos de ADN que comprendía Tris-HCl 20 mM, (NH₄)SO₄ 10 mM, KCl 10mM, MnCl₂ 2 mM, Triton X-100 al 0.1%, 1000 pmol de dATP, 1000 pmol de dCTP, 1000 pmol de dGTP, 1000 pmol de dTTP, 200 pmol de 3'-O-propargil-dTTP, 6.25 pmol de cebador R_ke2_trP11T_bio (SEQ ID NO: 2) y 2 unidades de ADN polimerasa THERMINATOR II (New England BioLabs) en un volumen de reacción final de 25 µl. Se usó como plantilla un volumen de 0,5 pmol de la plantilla KRAS (SEQ ID N°:1). La reacción de ampliación de la polimerasa se realizó usando un perfil de ciclos de temperatura que comprendía exponer la reacción a un temperatura de 95° C durante 2 minutos seguido de 50 ciclos de 95° C durante 15 segundos, 55° C durante 25 segundos y 65° C durante 35 segundos.

Después de la reacción de ampliación de polimerasa, se usó 1 µl de la mezcla de reacción directamente para el análisis del tamaño de ácido nucleico por electroforesis en gel (por ejemplo, usando un bioanizador Agilent 2100 y un chip de ensayo de ADN de alta sensibilidad). Los datos recopilados del análisis de tamaño mostraron que la reacción generó una población de fragmentos de ácido nucleico que tienen un rango de tamaños correspondiente a las longitudes esperadas de ácidos nucleicos que son complementarios a la plantilla y están terminados por 3'-O-propargil-dT en cada posición donde se espera la terminación.

Se realizaron experimentos adicionales de ampliación de polimerasa usando las condiciones de reacción descritas anteriormente y reemplazando el 3'-O-propargil-dTTP con 3'-O-propargil-dATP, 3'-O-propargil-dCTP, o 3'-O-propargil-dGTP. Los datos recopilados de estos experimentos indicaron de manera similar que las reacciones generaron poblaciones de fragmentos de ácido nucleico que tienen un rango de tamaños correspondiente a las longitudes esperadas de ácidos nucleicos que son complementarias a la plantilla y terminan en 3'-O-propargil-dA, 3'-O-propargil-dC, o 3'-O-propargil-dG en cada posición donde se espera la terminación.

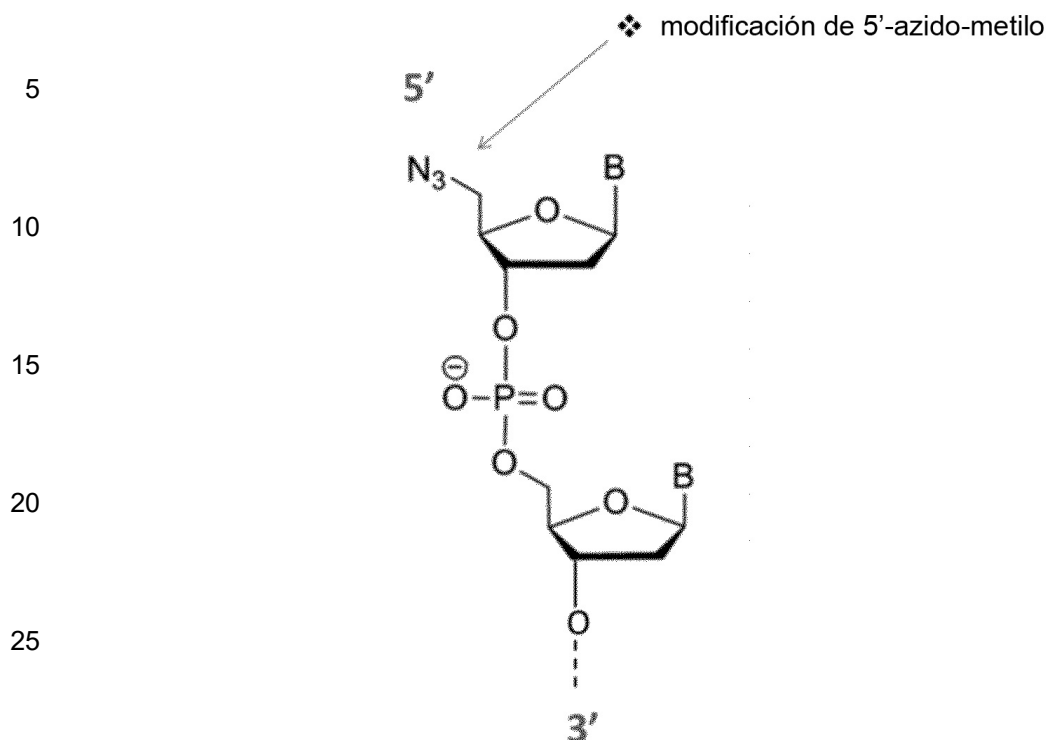
Ejemplo 6 - síntesis de oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se sintetizó y caracterizó un oligonucleótido que comprendía una modificación de 5'-azido-metilo. La síntesis del oligonucleótido modificado se realizó usando síntesis química de fosforamidita. En el último paso sintético, se usó la síntesis química de fosforamidita para incorporar una fosforamidita 5'-yodo-dT en la posición terminal 5'. El oligonucleótido unido al soporte sólido en la columna de reacción se trató entonces como sigue.

Primero, la azida de sodio (30 mg) se resuspendió en DMF seco (1 ml), se calentó durante 3 horas a 55° C y se enfrió a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió con una jeringuilla de 1 ml y se pasó de un lado a otro a través de la columna de reacción que comprendía el oligonucleótido modificado con yodo 5' y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Después de la incubación, la columna se lavó con DMF seco, se lavó con acetonitrilo y luego se secó con gas argón. El oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo resultante se escindió del soporte sólido y se desprotegió calentando en amoniaco acuoso durante 5 horas a 55° C. El producto final fue un oligonucleótido que tiene la secuencia que se muestra a continuación:

Az-TCTGAGTCGGAGACACGCAGGGATGAGATGGT (SEQ ID NO: 6)

La "Az" indica la modificación de azido-metilo en el extremo 5' (por ejemplo, modificación de 5'-azido-metilo), por ejemplo, para proporcionar un oligonucleótido que tiene una estructura de acuerdo con:



35 donde B es la base del nucleótido (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina o una nucleobase natural o sintética, por ejemplo, una purina modificada como hipoxantina, xantina, 7-metilguanina; una pirimidina modificada como 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina; etc.).

35 Ejemplo 7 - conjugación de oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo y fragmentos de ácido nucleico modificado con 3'-O-propargilo

40 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para probar la conjugación de un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo (por ejemplo, ver el Ejemplo 6) a fragmentos de ácido nucleico modificado con 3'-O-propargilo (por ejemplo, ver Ejemplo 5) por química clic. En particular, se realizaron experimentos en los que un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo se conjugó químicamente con fragmentos de ADN modificado con 3'-O-propargilo usando química de cicloadición de 1,3-dipolar alquino-azida catalizada por cobre ("química clic").

45 La química clic se realizó usando reactivos disponibles comercialmente (baseclick GmbH, kit de recarga Oligo-Click-M) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se hicieron reaccionar aproximadamente 0,1 pmoles de fragmentos de ADN modificado con 3'-O-propargilo que comprendían una modificación de 5'-biotina con aproximadamente 500 pmoles de oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo (ver, por ejemplo, el Ejemplo 6, por ejemplo, SEQ ID NO: 6) usando el reactivo de química clic en un volumen total de 10 μ l. La mezcla de la reacción se incubó a 45° C durante 30 minutos. Después de la incubación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se añadió un volumen de 40 μ l del tampón de unión y lavado suministrado comercialmente (por ejemplo, NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). El producto de la reacción conjugado se aisló del exceso de oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo incubando la mezcla de reacción de química clic con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads, MyOne Streptavidin C1, Life Technologies) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se separaron del sobrenadante usando un imán y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, las perlas se lavaron dos veces usando el tampón de unión y lavado y luego se resuspendieron en 25 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH aproximadamente 8).

60 El producto se escindió del soporte sólido (perla) usando escisión con uracilo (uracil glucosilasa y endonucleasa VIII, enzimática). En particular, se usaron reactivos de escisión de uracilo para escindir los productos de reacción en el sitio de la modificación de desoxiuridina localizada cerca de la localización 5'-terminal del producto conjugado (ver SEQ ID NO: 2-5). Finalmente, el sobrenadante que comprendía el producto conjugado se purificó usando Ampure XP (Beckman Coulter) siguiendo el protocolo del fabricante y se eluyó en 20 μ l de tampón TE.

65 Ejemplo 8 - amplificación de producto conjugado

Durante el desarrollo de realizaciones de la tecnología descrita en la presente, se realizaron experimentos para caracterizar la conjugación química del oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo a los fragmentos de ácido nucleico modificado con 3'-O-propargilo y para evaluar el enlace de triazol como un imitador de un enlace fosfodiéster natural en una estructura fundamental de ácido nucleico. Para probar la capacidad de una polimerasa para reconocer el producto conjugado como plantilla y atravesar el enlace de triazol durante la síntesis, los cebadores de PCR se diseñaron para producir amplicones que abarcan el enlace de triazol de los productos de conjugación:

Cebador 1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	SEQ ID NO: 7
Cebador 2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTC	SEQ ID NO: 8

Se usó una premezcla de PCR disponible comercialmente (KAPA 2G HS, KAPA Biosystems) para proporcionar una mezcla de reacción de 25 µl que comprendía, además de los componentes proporcionados por la mezcla (por ejemplo, tampón, polimerasa, dNTP), 0,25 µM de cebador 1 (SEQ ID NO: 7), 0,25 µM de cebador 2 (SEQ ID NO: 8) y 2 µl de producto conjugado purificado (ver Ejemplo 7) como plantilla para la amplificación. La mezcla de reacción se sometió a un ciclo térmico incubando la muestra a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 98° C durante 20 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 20 segundos. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel (por ejemplo, usando un sistema Agilent Bioanalyzer 2100 y un chip de ADN de alta sensibilidad) para determinar las distribuciones de tamaño de los productos de la reacción.

El análisis de los productos de amplificación indicó que la reacción de amplificación produjo exitosamente amplicones usando los productos conjugados de la reacción de química clic (ver Ejemplo 7) como plantillas para la amplificación. En particular, el análisis de los productos de amplificación indicó que la polimerasa procesada a lo largo de la plantilla y a través del enlace de triazol produjo amplicones a partir de la plantilla. Además, la amplificación produjo una población heterogénea de amplicones que tenían un intervalo de tamaños correspondiente a los tamaños esperados producidos por la amplificación de los fragmentos de ADN terminados específicos de la base mediante la incorporación del 3'-O-propargil-dNTP. El análisis de fragmentos también mostró el aumento de tamaño de fragmento apropiado correspondiente a treinta y una (31) bases adicionales del oligonucleótido conjugado con 5'-azido-metil modificado.

Ejemplo 9 - generación de escalera usando terminación 3'-O-propargil dNTP

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para evaluar la generación de fragmentos de ácido nucleico terminados en una reacción que comprende una mezcla de 3'-O-propargil-dNTP y dNTP naturales (estándar). En particular, se llevaron a cabo experimentos para evaluar la generación de fragmentos terminados en cada posición dentro de la región objetivo mediante la incorporación de 3'-O-propargil-dNTP que terminan en cadena por la ADN polimerasa durante la síntesis.

Los experimentos se llevaron a cabo usando una mezcla de dNTP naturales y los cuatro 3'-O-propargil-dNTP en una única reacción. La mezcla de la reacción de generación de fragmentos de ADN comprendía Tris-HCl 20 mM, (NH₄)SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MnCl₂ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, 1000 pmol de dATP, 1000 pmol de dCTP, 1000 pmol de dGTP, 1000 pmol de dTTP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dATP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dCTP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dGTP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dTTP, 6,25 pmol de cebador R_ke2_trP1_T_bio (SEQ ID NO: 2) y 2 unidades de ADN polimerasa Therminator II (New England BioLabs) en un volumen de reacción de 25 µl. Se usaron 0,5 pmoles de amplicón purificado correspondiente a una región en el exón 2 de KRAS (SEQ ID NO: 1) como molde. La reacción de ampliación de polimerasa se termocicló calentando a 95° C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos a 95° C durante 15 segundos, 55° C durante 25 segundos y 65° C durante 35 segundos.

Después de la reacción de ampliación de la polimerasa, se usó 1 µl de la mezcla de reacción directamente para el análisis del tamaño del fragmento de ADN usando electroforesis en gel (bioanalizador Agilent 2100 y chip de ensayo de ADN de alta sensibilidad). El análisis del tamaño de fragmento de los productos de reacción indicó que la reacción de generación de fragmentos produjo con éxito una escalera de fragmentos de ácido nucleico que tenía los tamaños esperados.

Posteriormente, se conjugó químicamente un oligonucleótido modificado con 5'-azido-metilo (ver, por ejemplo, Ejemplo 6, por ejemplo, SEQ ID NO: 6) con los fragmentos de ADN terminados que comprendían 3'-O-propargil-dN usando química clic como se describe en el ejemplo 6 y el Ejemplo 7 anteriores. Después de la conjugación, se realizó una reacción de amplificación para amplificar los productos conjugados como se describe en el Ejemplo 8. El análisis del tamaño de fragmentos de ADN de los amplicones producidos a partir de los productos conjugados mostró el cambio esperado en el tamaño resultante de la conjugación del oligonucleótido modificado con 5'-azido a los amplicones producidos a partir de la escalera de fragmentos.

Ejemplo 10 - control del tamaño del fragmento

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en la presente, se realizaron experimentos para controlar la distribución del tamaño de los fragmentos de ácido nucleico terminados producidos en una reacción que comprende una mezcla de 3'-O-propargil-dNTP y dNTP naturales (estándar) ajustando la proporción de 3'-O-propargil-dNTP a dNTP naturales (estándar). Se contempló que la relación molar de 3'-O-propargil-dNTP y dNTP naturales afecta a la distribución del tamaño del fragmento debido a la competencia entre los 3'-O-propargil-dNTP (que terminan la ampliación) y los dNTP naturales (que alargan el producto de la polimerasa) para su incorporación en el ácido nucleico sintetizado por la polimerasa.

10 Por consiguiente, se realizaron experimentos en los que los productos de las reacciones de generación de fragmentos de escalera se evaluaron a varias relaciones molares de 3'-O-propargil-dNTP a dNTP naturales. Las reacciones de generación de escalera de fragmentos se realizaron usando relaciones molares de 2:1, 10:1 y 100:1 de dNTP naturales a 3'-O-propargil-dNTP. Las mezclas de reacción de generación de fragmentos usadas en estos experimentos comprendieron Tris-HCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MnCl₂ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, 1000 pmol de dATP, 1000 pmol de dCTP, 1000 pmol de dGTP, 1000 pmol de dTTP, 6,25 pmol de cebador R_ke2_trP1_T_bio (SEQ ID NO: 2), 2 unidades de ADN polimerasa Terminator II (New England BioLabs), y 0,5 pmoles de amplicón purificado correspondiente a una región en el exón 2 de KRAS (SEQ ID NO: 1) como plantilla a un volumen de reacción final de 25 µl.

20 Además, las reacciones que probaron una relación 2:1 de dNTP naturales a 3'-O-propargil-dNTP comprendieron 500 pmol de 3'-O-propargil-dATP, 500 pmol de 3'-O-propargil-dCTP, 500 pmol de 3'-O-propargil-dGTP y 500 pmol de 3'-O-propargil-dTTP. Las reacciones que probaron una relación 10:1 de dNTP naturales a 3'-O-propargil-dNTP comprendieron 100 pmol de 3'-O-propargil-dATP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dCTP, 100 pmol de 3'-O-propargil-dGTP, y 100 pmol de 3'-O-propargil-dTTP. Las reacciones que probaron una relación de 100:1 de dNTP naturales a 3'-O-propargil-dNTP comprendieron 10 pmol de 3'-O-propargil-dATP, 10 pmol de 3'-O-propargil-dCTP, 10 pmol de 3'-O-propargil-dGTP y 10 pmol de 3'-O-propargil-dTTP.

30 Las reacciones de ampliación de la polimerasa se sometieron a ciclos de temperatura incubando a 95° C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos a 95° C durante 15 segundos, 55° C durante 25 segundos y 65° C durante 35 segundos. Después de la reacción de ampliación de la polimerasa, los oligonucleótidos modificados con 5'-azido-metilo (ver, por ejemplo, Ejemplo 6, por ejemplo, SEQ ID NO: 6) se conjugaron químicamente a los fragmentos de ácido nucleico terminados con 3'-O-propargil-dN usando química clic como se describe en el Ejemplo 6 y el Ejemplo 7. Después de la conjugación, los productos de conjugación se usaron como plantillas para la amplificación para producir amplicones correspondientes a los productos conjugados como se describe en el Ejemplo 8. Se realizó análisis de tamaños de fragmentos en los productos conjugados.

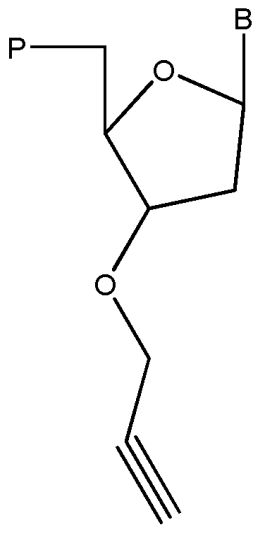
35 El análisis de tamaños de fragmentos de los productos de conjugación amplificados producidos a partir de los productos de las tres condiciones diferentes de relación molar indicó que el tamaño del fragmento dependía de la proporción de 3'-O-propargil-dNTP a dNTP naturales. El análisis de los tamaños de los fragmentos muestra un cambio en la distribución de tamaños de los fragmentos en función de las relaciones molares de dNTP a 3'-O-propargil-dNTP. En la relación molar 2:1, se detectaron poblaciones más grandes de fragmentos más cortos en comparación con las otras dos condiciones de relación molar. En la relación molar 10:1, hay una fracción mayor de fragmentos más largos en relación con la relación molar 2:1. En la relación molar 100:1, la población principal de fragmentos comprendía fragmentos de ADN más largos en relación con las otras dos relaciones molares.

45 Varias modificaciones y variaciones de las composiciones, métodos y usos descritos de la tecnología serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la tecnología se ha descrito con respecto a realizaciones ejemplares específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en la técnica estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de reacción que comprende una mezcla de dNTP y uno o más análogos de nucleótidos de 3'-O-propargilo que tienen una estructura de acuerdo con:

5



10

15

20

25

en donde B es una base y P comprende una fracción de fosfato, en donde P se selecciona del grupo que consiste de un tetrafosfato, un trifosfato, un difosfato o un monofosfato, y una polimerasa para sintetizar un ácido nucleico usando los dNTP y uno o más análogos de nucleótidos 3'-O-bloqueados.

30

2. La mezcla de reacción de la reivindicación 1, que comprende además un ácido nucleico objetivo.

3. La mezcla de reacción de la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico objetivo es un amplicón.

35

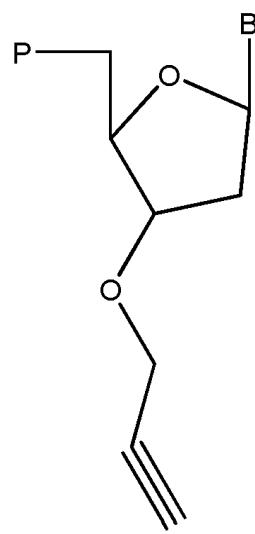
4. La mezcla de reacción de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la polimerasa es de una especie *Thermococcus* 9° N-7 y comprende una o más mutaciones seleccionadas de D141A, E143A, Y409V, y A485L.

5. La mezcla de reacción de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que la proporción de dNTP a análogos de nucleótidos de 3'-O-propargil es de 1:500 a 500:1.

40

6. Una biblioteca de NGS que comprende una pluralidad de ácidos nucleicos, en donde cada ácido nucleico comprende un 3'-O-propargil-nucleótido que tiene una estructura de acuerdo con:

45



50

55

60

65

en donde B es una base y P comprende un monofosfato.

7. La biblioteca de NGS de la reivindicación 6, en donde cada ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos comprende una subsecuencia de una secuencia de ácido nucleico objetivo.

8. La biblioteca de NGS de la reivindicación 6, en donde cada ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos se conjuga con un oligonucleótido mediante un enlace de triazol.

9. La mezcla de reacción de la reivindicación 1 o la biblioteca de NGS de la reivindicación 6, en donde B se selecciona del grupo que consiste de una purina, una pirimidina, una purina modificada o una pirimidina modificada.

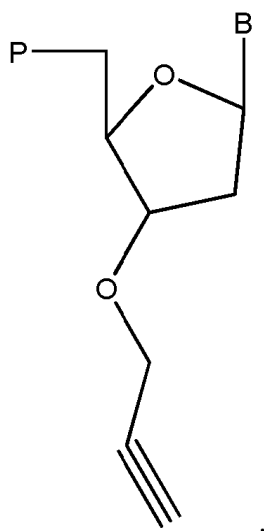
10. La mezcla de reacción de la reivindicación 1 o la biblioteca de NGS de la reivindicación 6, en donde B se selecciona del grupo que consiste de citosina, guanina, adenina, timina y uracilo.

11. La mezcla de reacción de la reivindicación 1, en la que P comprende un trifosfato.

12. Un método para secuenciar un ácido nucleico, el método comprendiendo:

a) hibridar un cebador con una plantilla de ácido nucleico para formar un complejo de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado;

b) proporcionar una pluralidad de análogos de nucleótidos, cada análogo de nucleótido comprendiendo una fracción de alquino, en donde los análogos de nucleótidos son análogos de nucleótidos 3'-O-propargil-dNTP que tienen una estructura de acuerdo con:



en donde P es un trifosfato y N se selecciona del grupo que consiste de A, C, G, T y U;

c) hacer reaccionar el complejo de cebador/plantilla de ácido nucleico hibridado y el análogo de nucleótido con una polimerasa para añadir el análogo de nucleótido al cebador mediante una reacción de polimerasa para formar un producto ampliado que comprende un análogo de nucleótido incorporado; y

d) hacer reaccionar el producto ampliado con un compuesto que contiene azida para formar una estructura que comprende un anillo de triazol.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la estructura que comprende un anillo de triazol se usa en reacciones enzimáticas posteriores.

14. El método de la reivindicación 13 en donde la reacción enzimática posterior es una reacción en cadena de la polimerasa.

15. El método de la reivindicación 12 que comprende proporcionar nucleótidos convencionales.

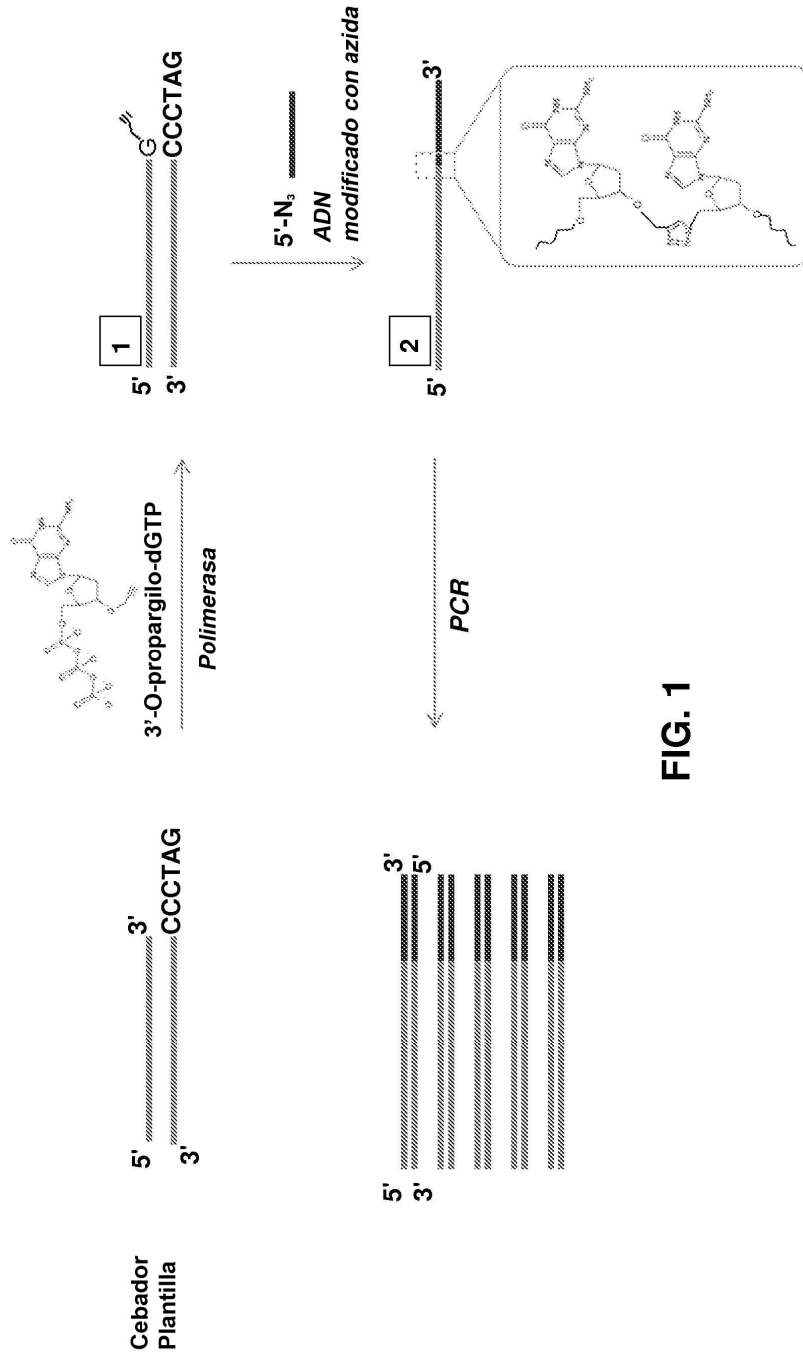


FIG. 1

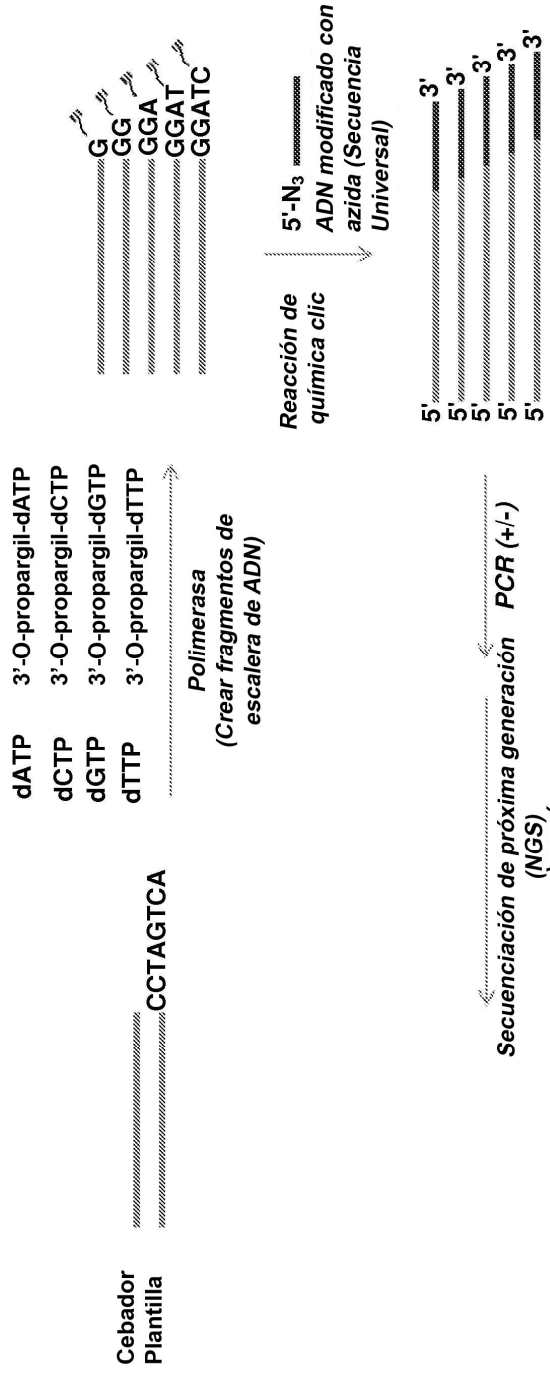


FIG. 2

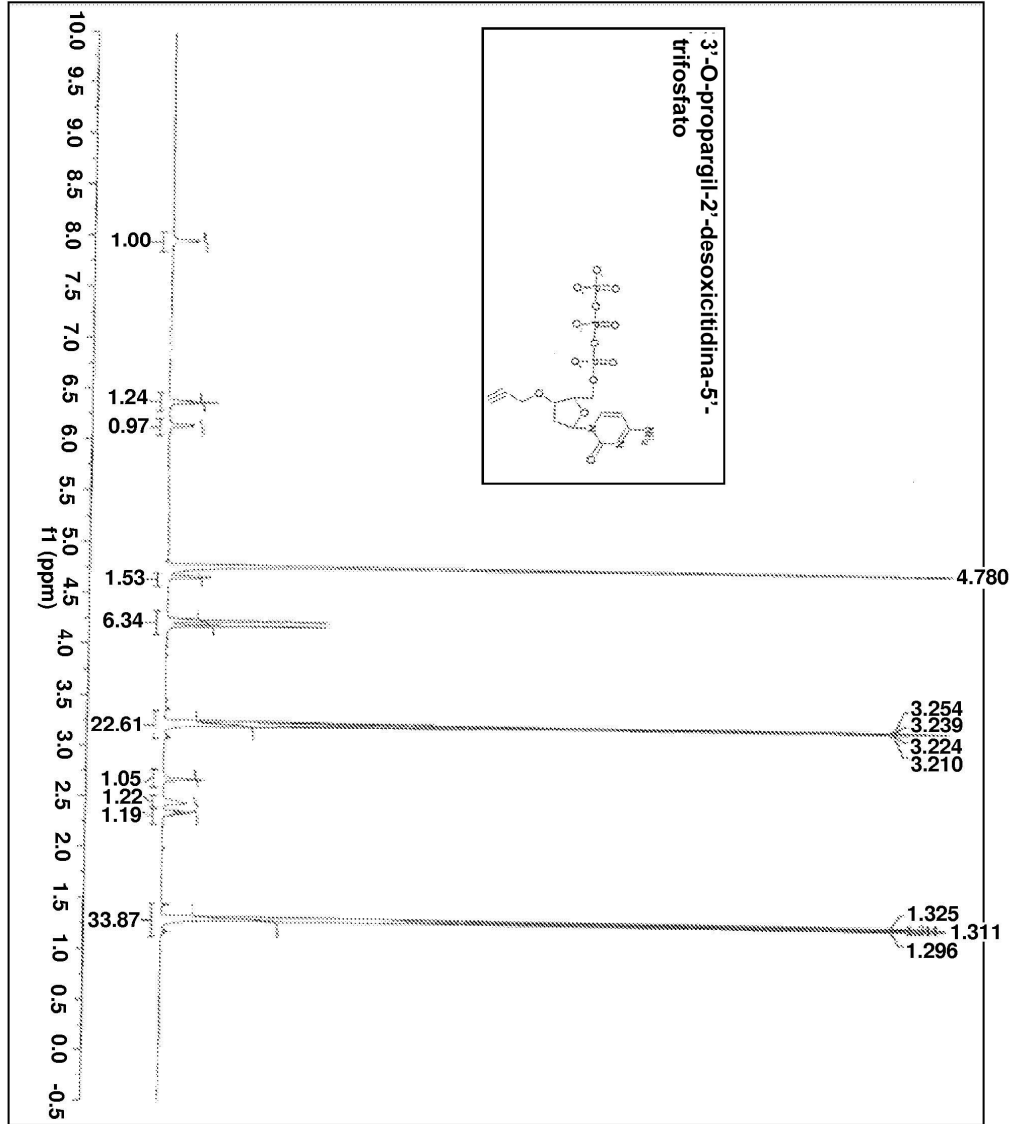


FIG. 3A

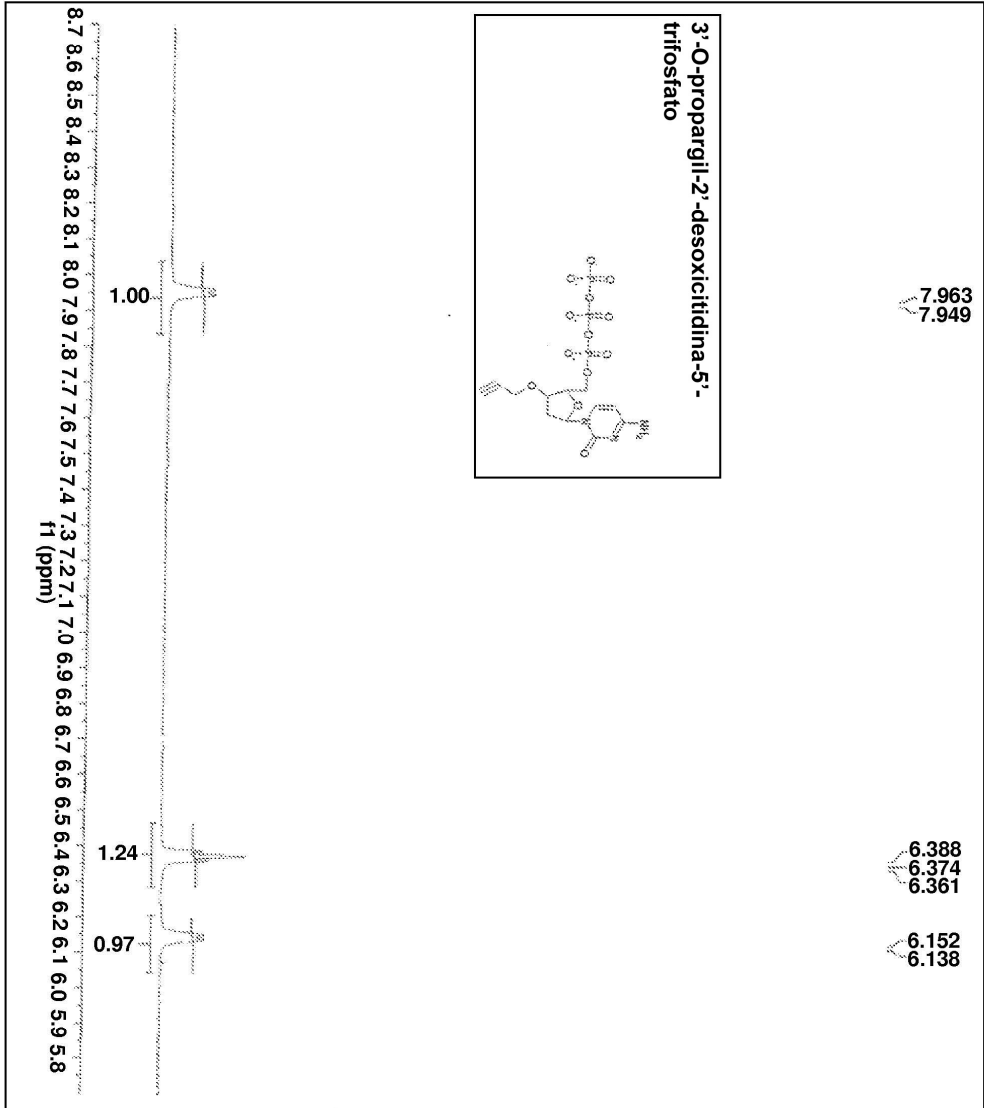


FIG. 3B

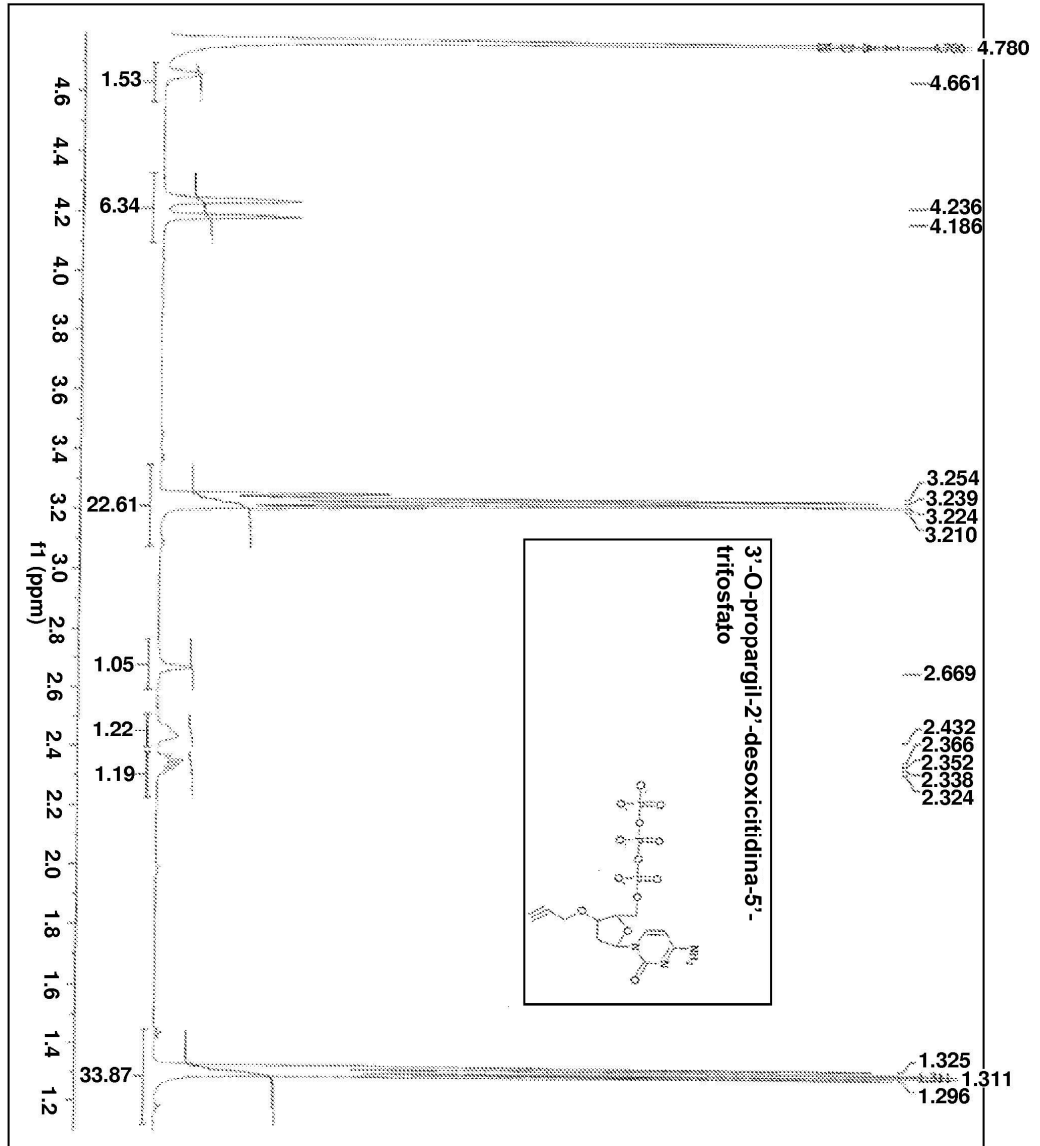


FIG. 3C

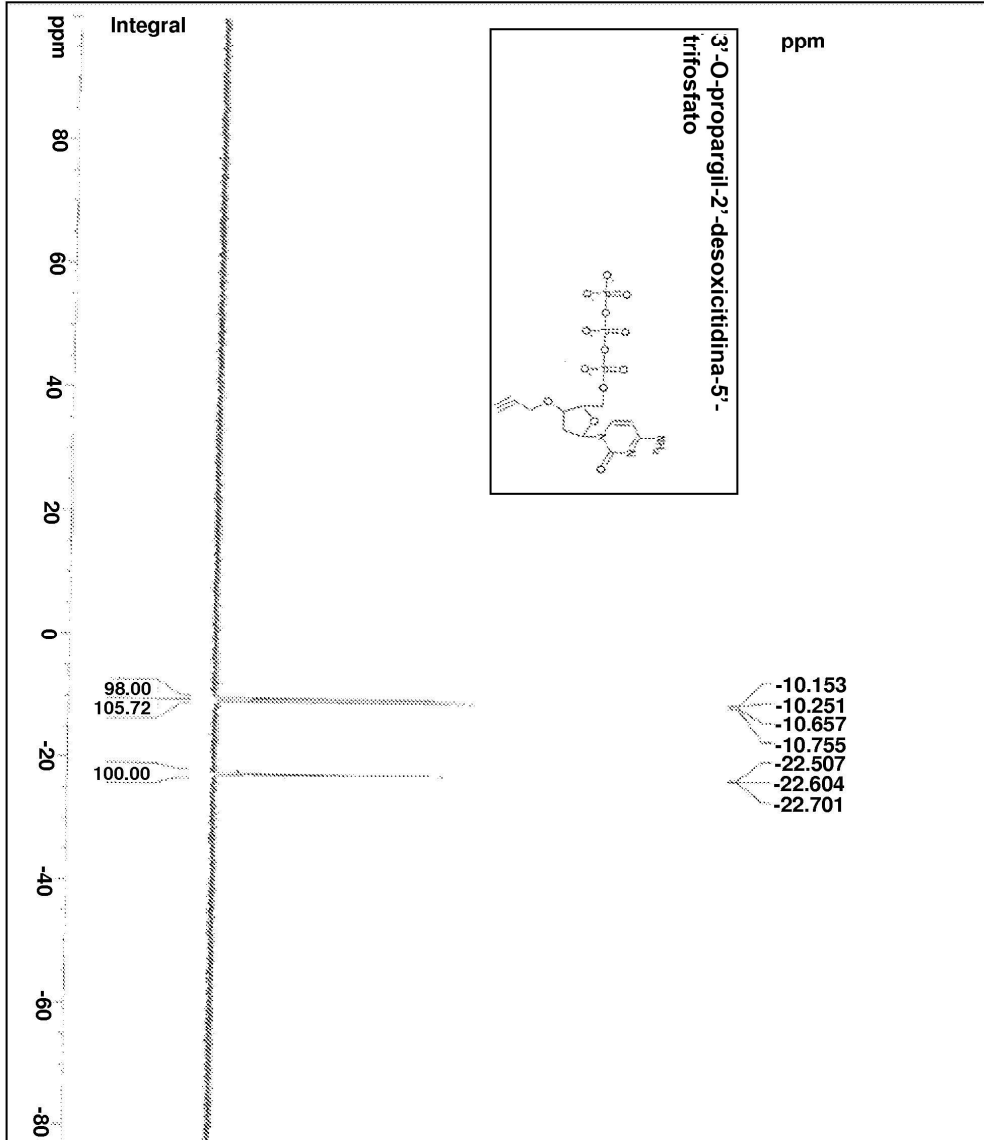


FIG. 3D

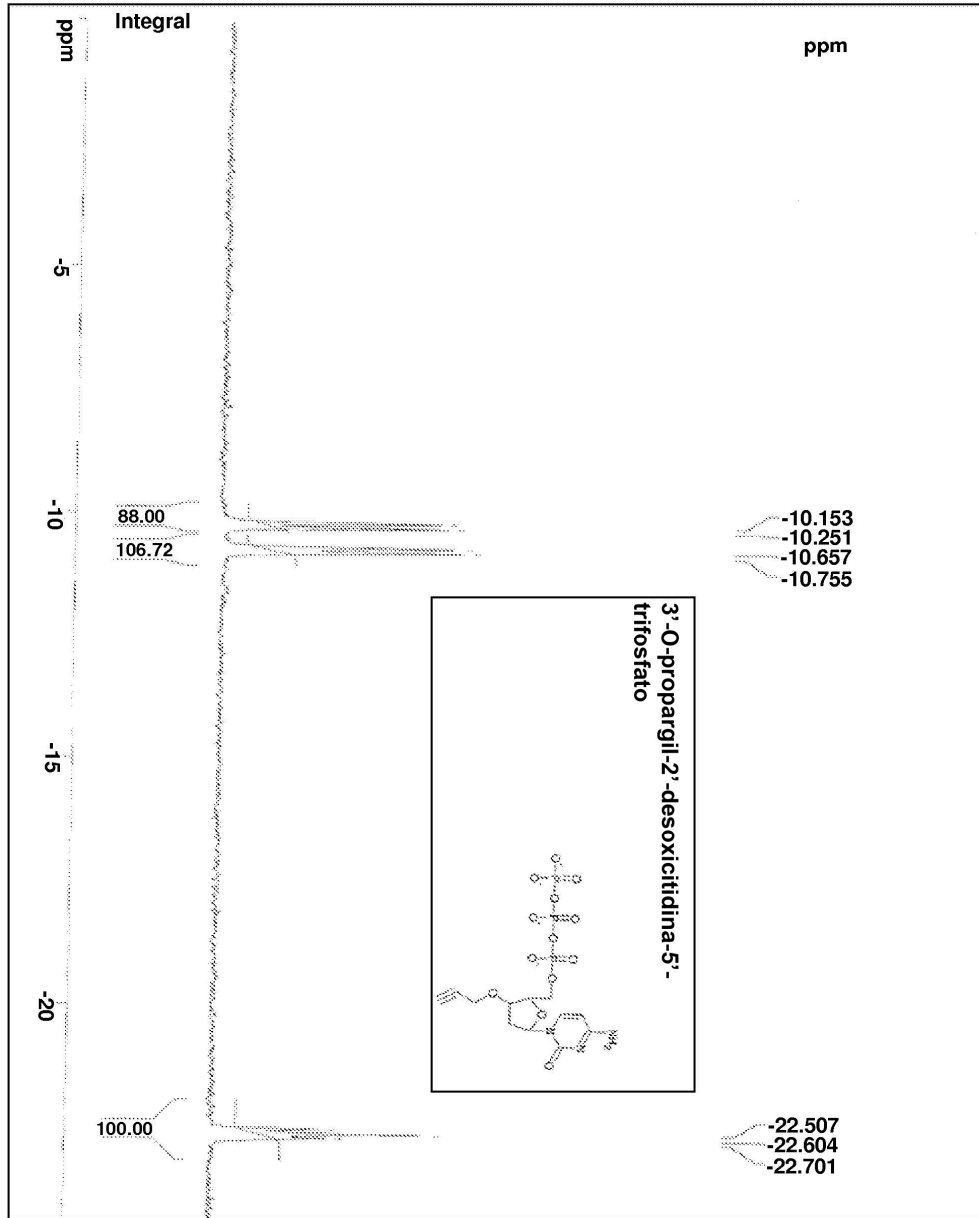


FIG. 3E

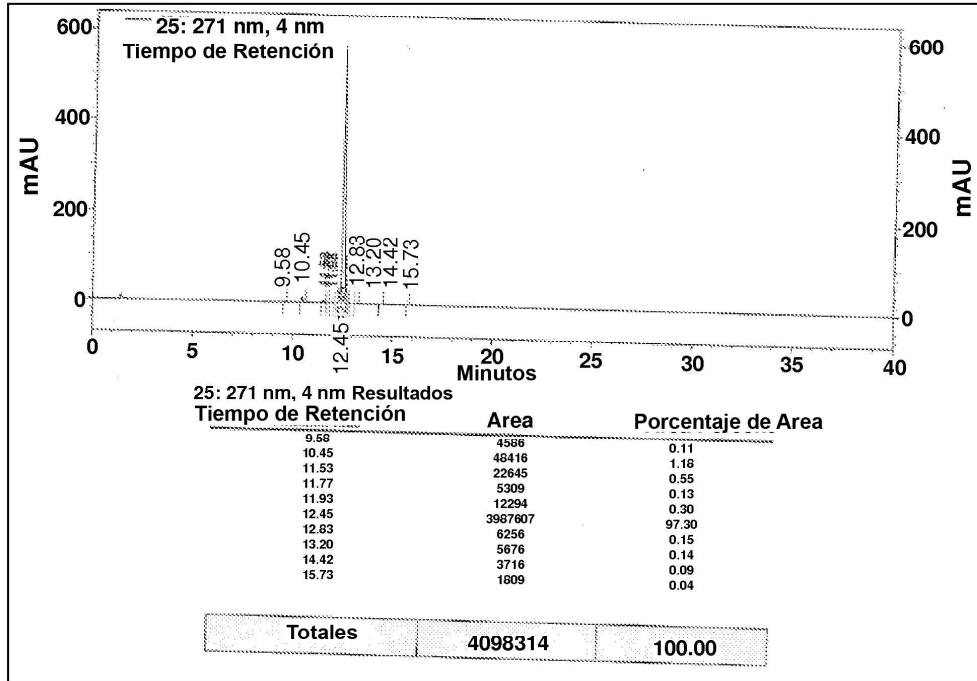


FIG. 3F

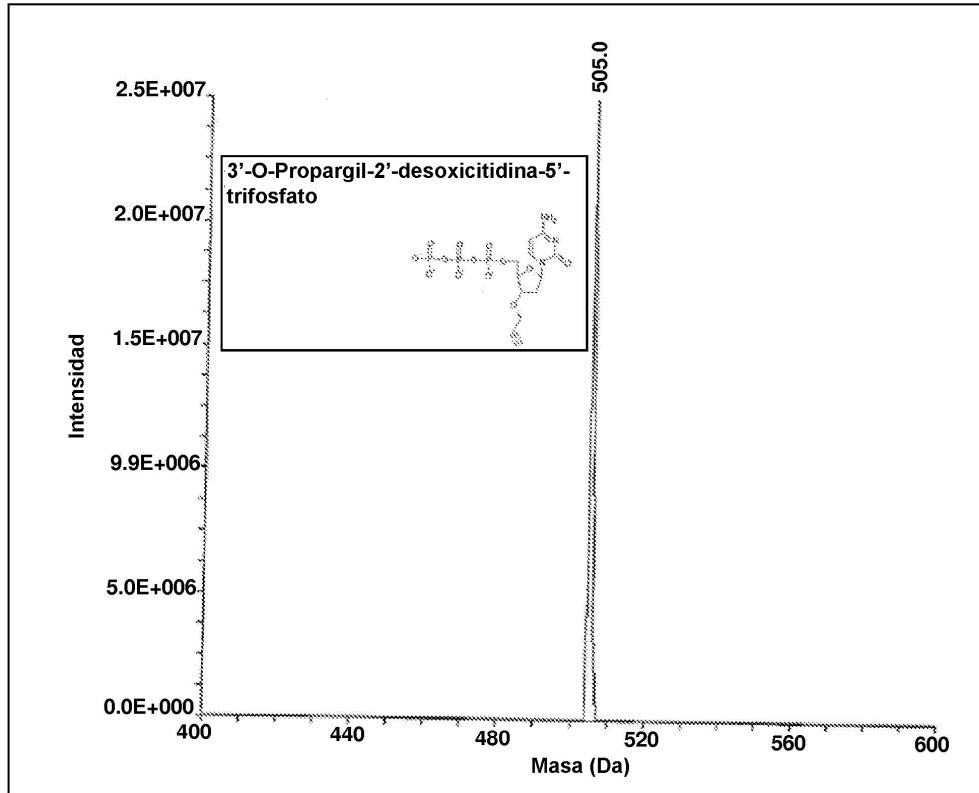


FIG. 3G

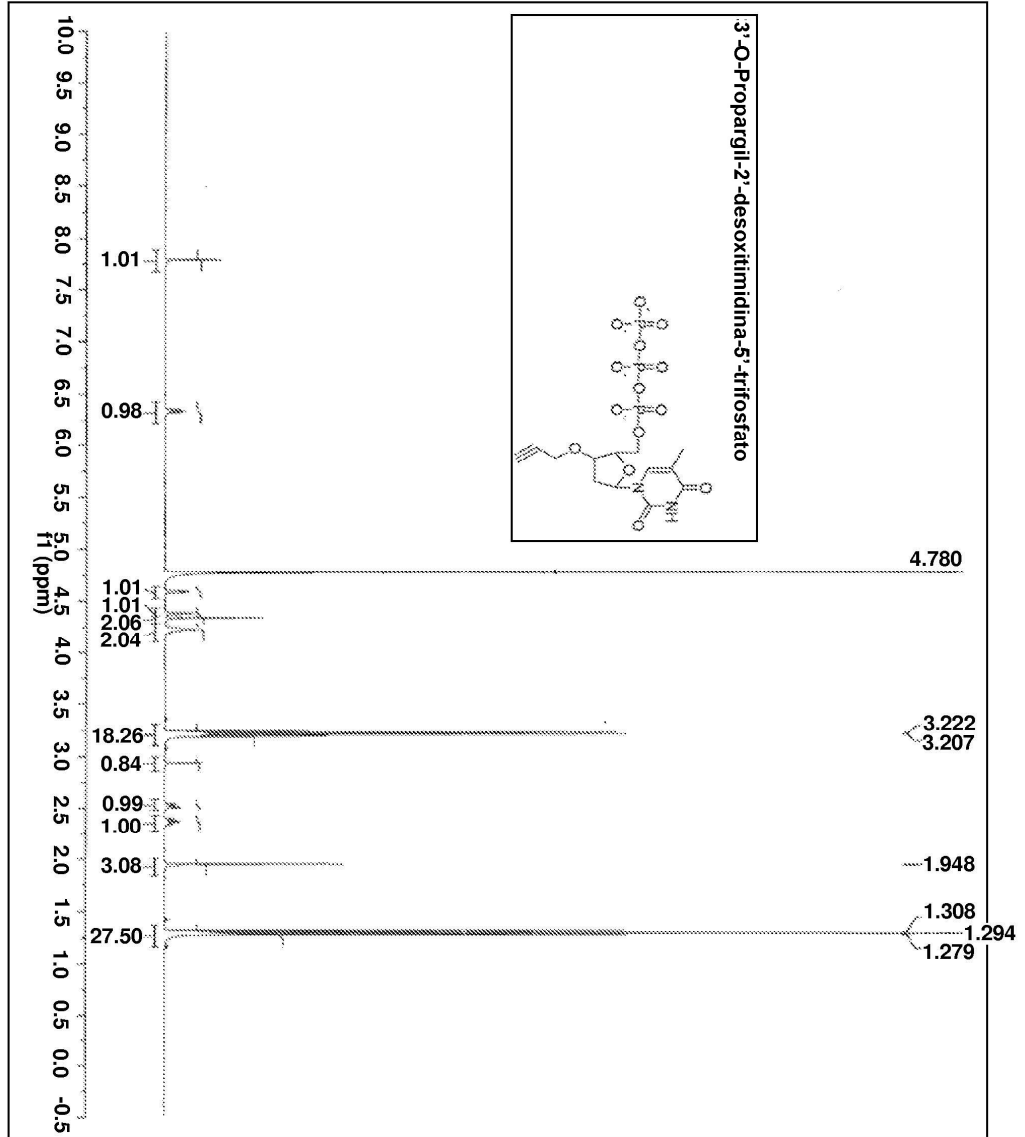


FIG. 4A

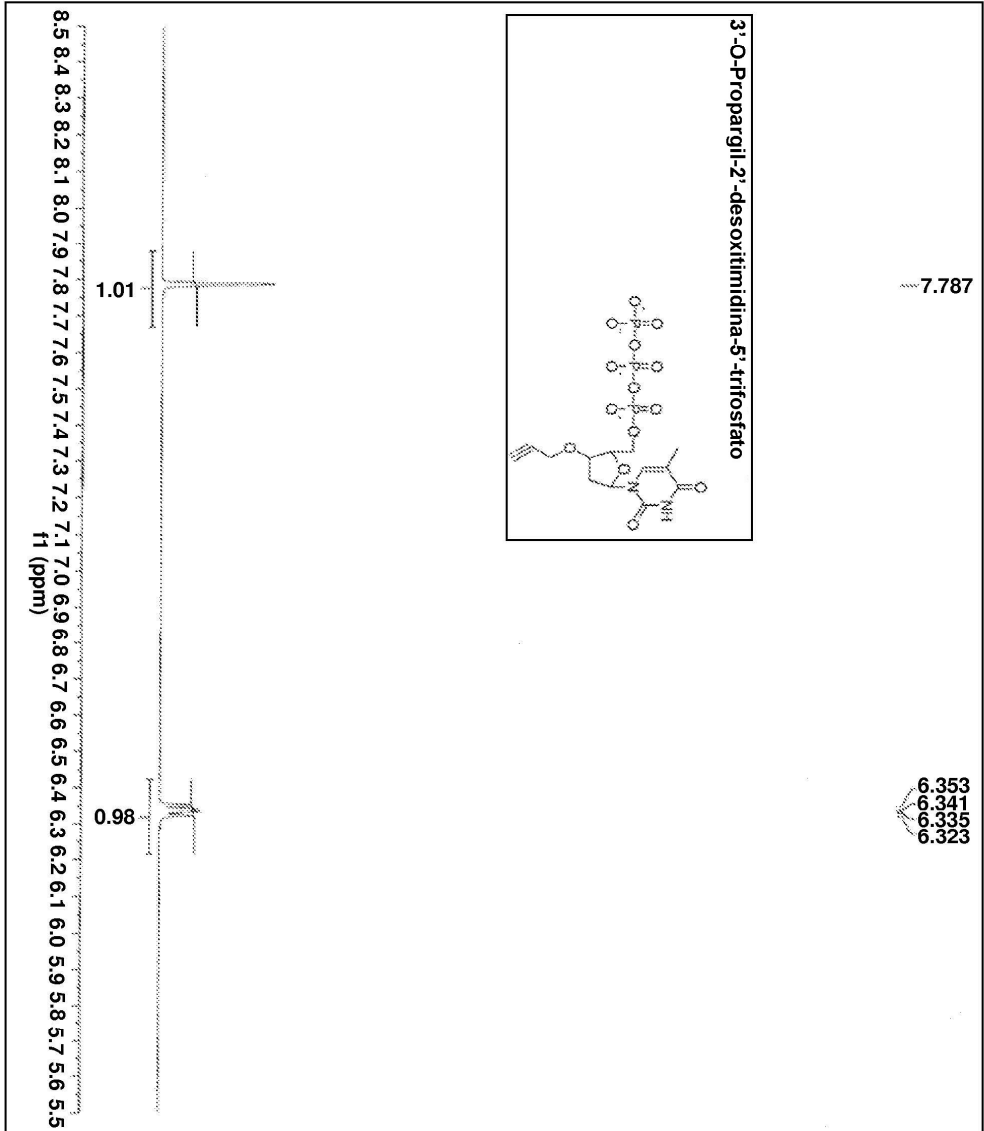


FIG. 4B

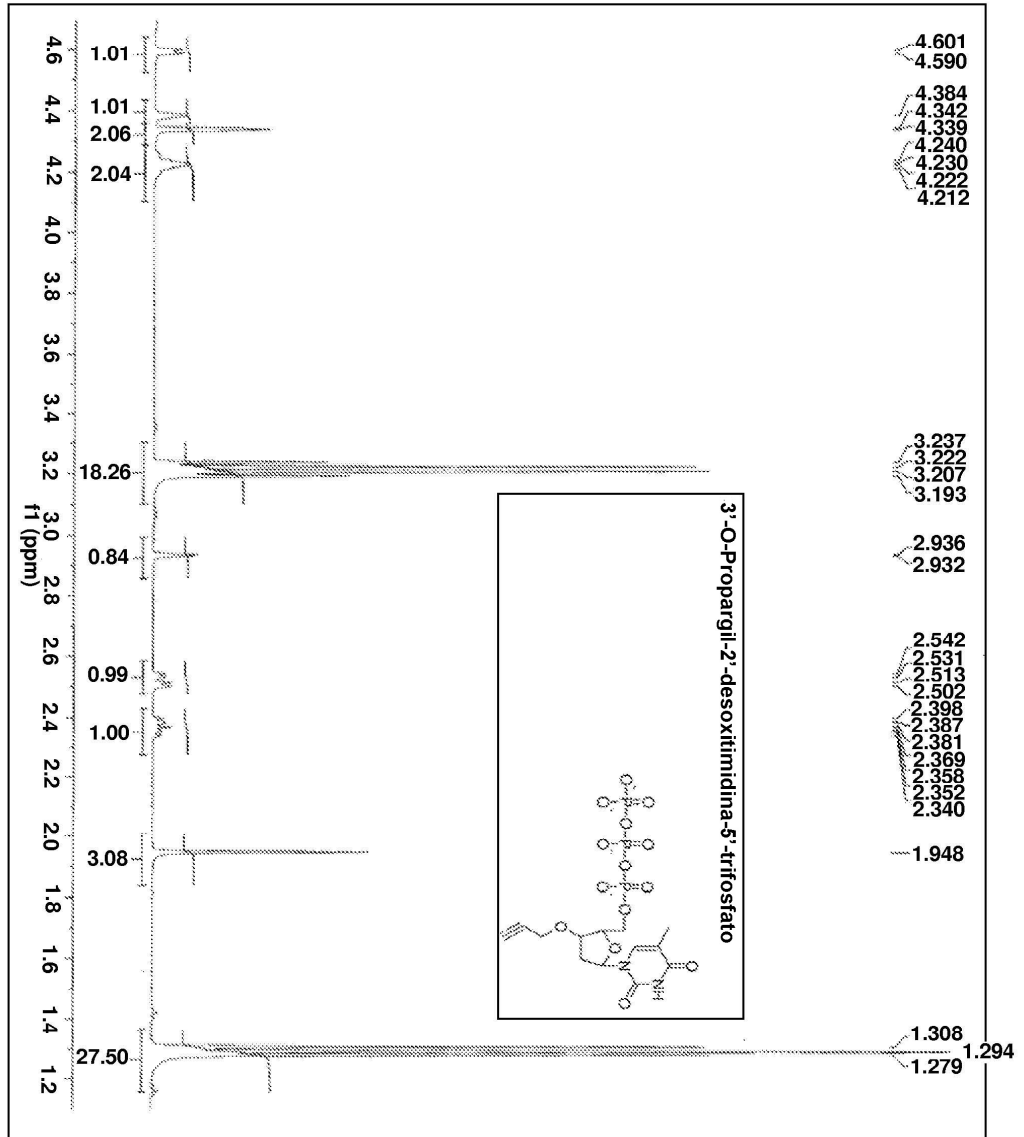


FIG. 4C

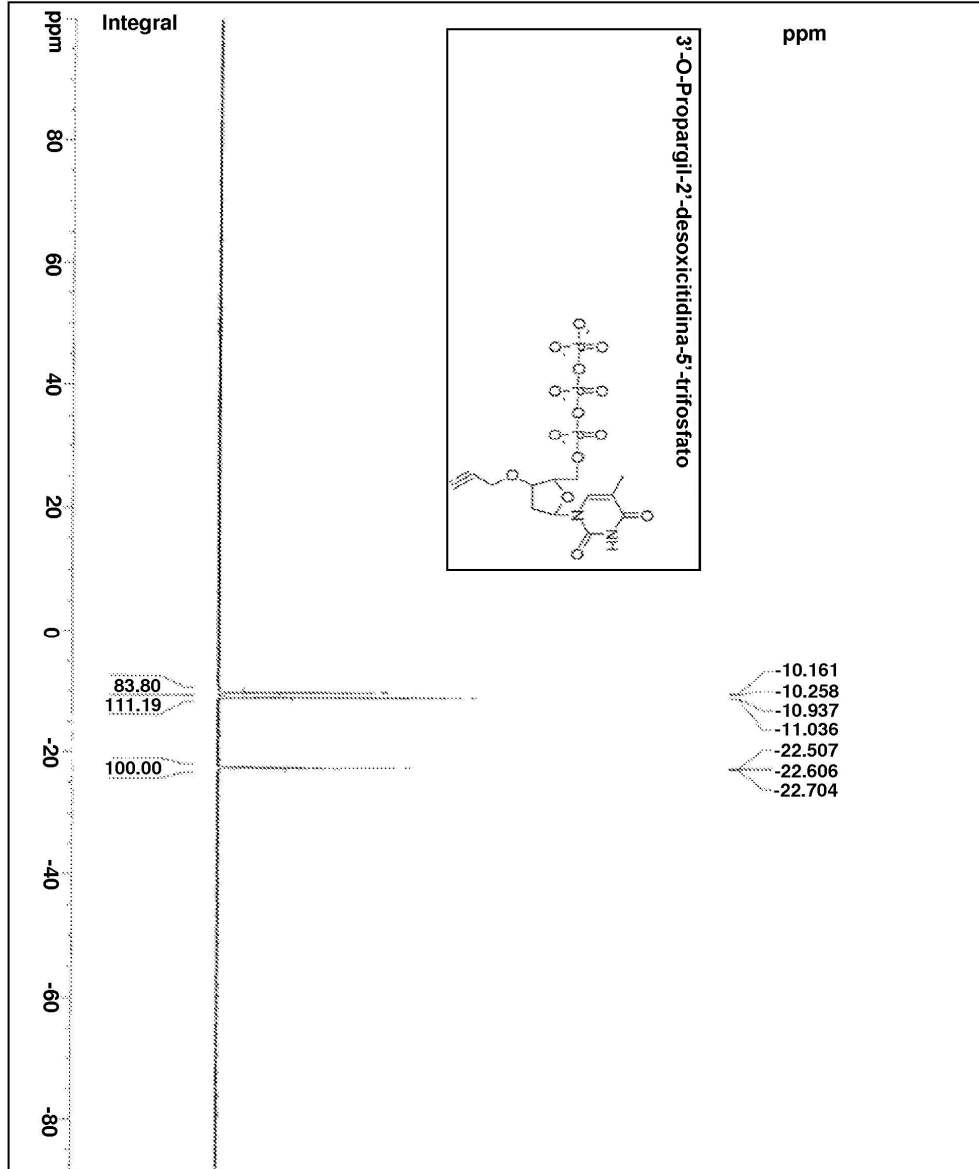


FIG. 4D

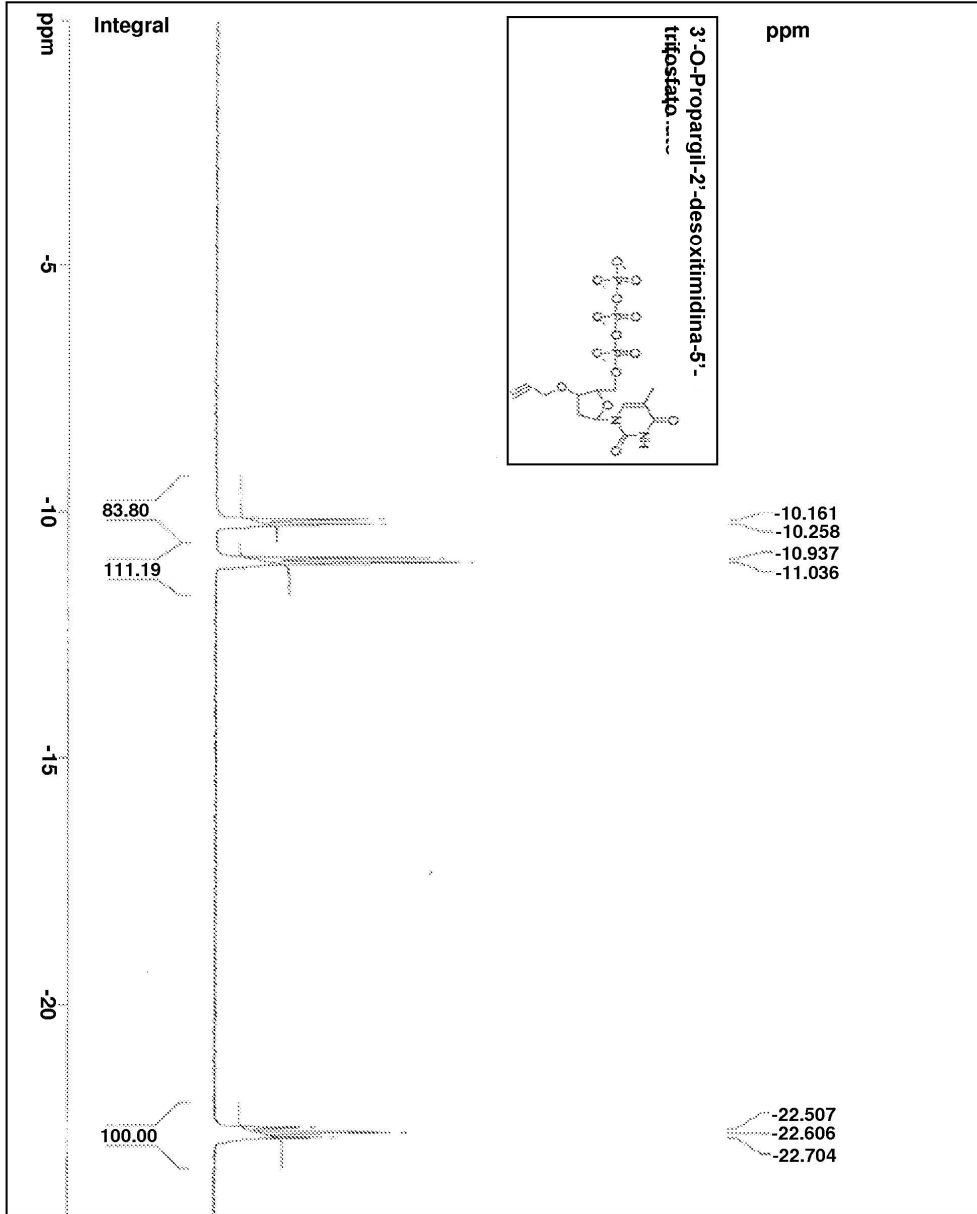


FIG. 4E

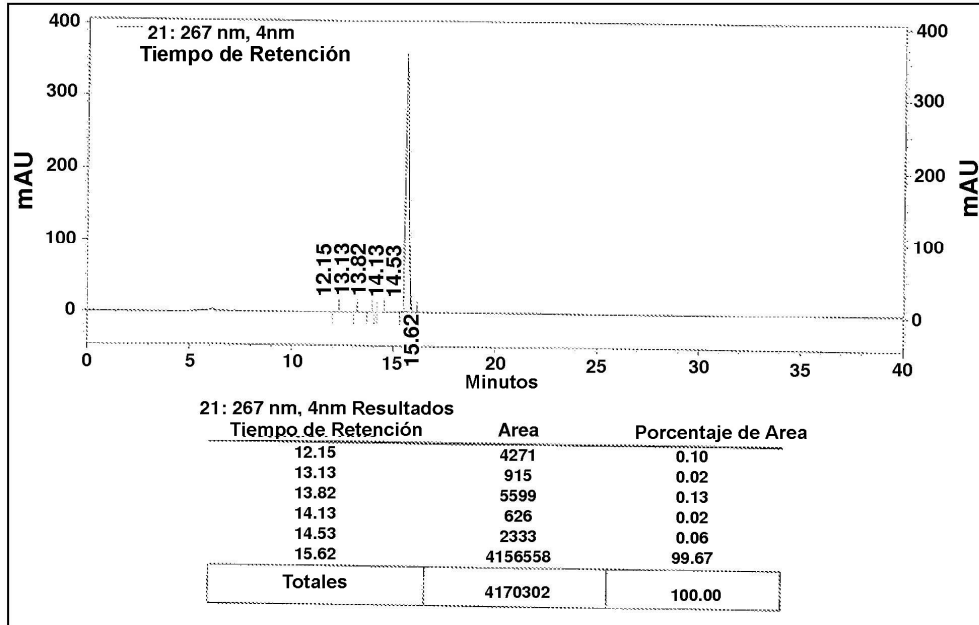


FIG. 4F

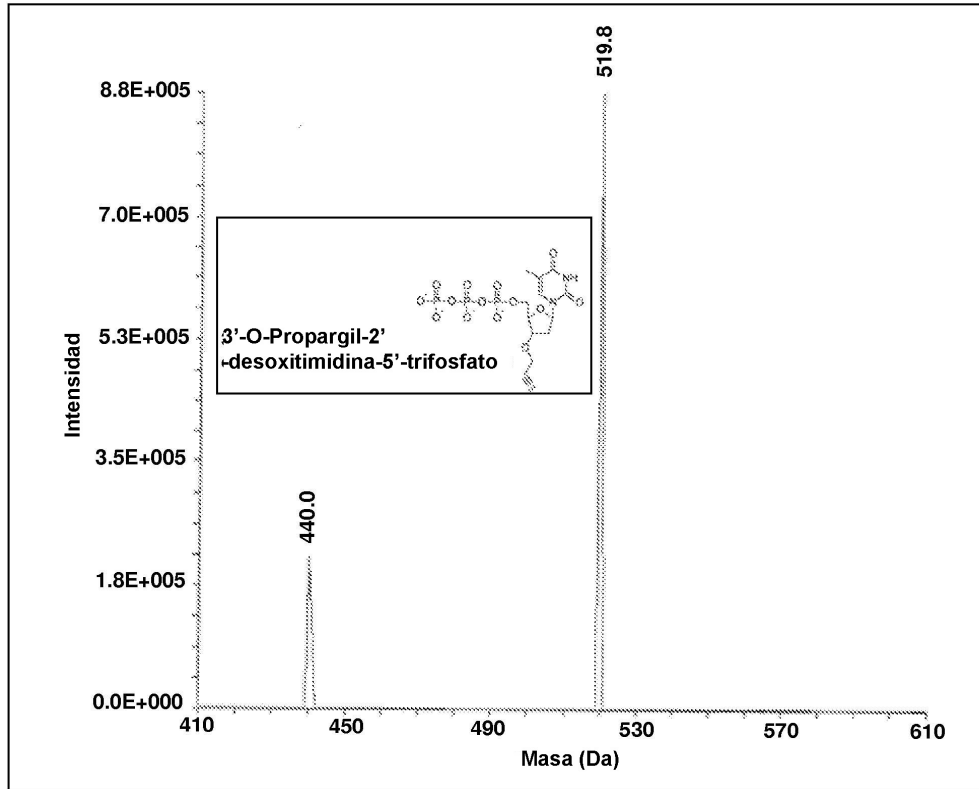


FIG. 4G

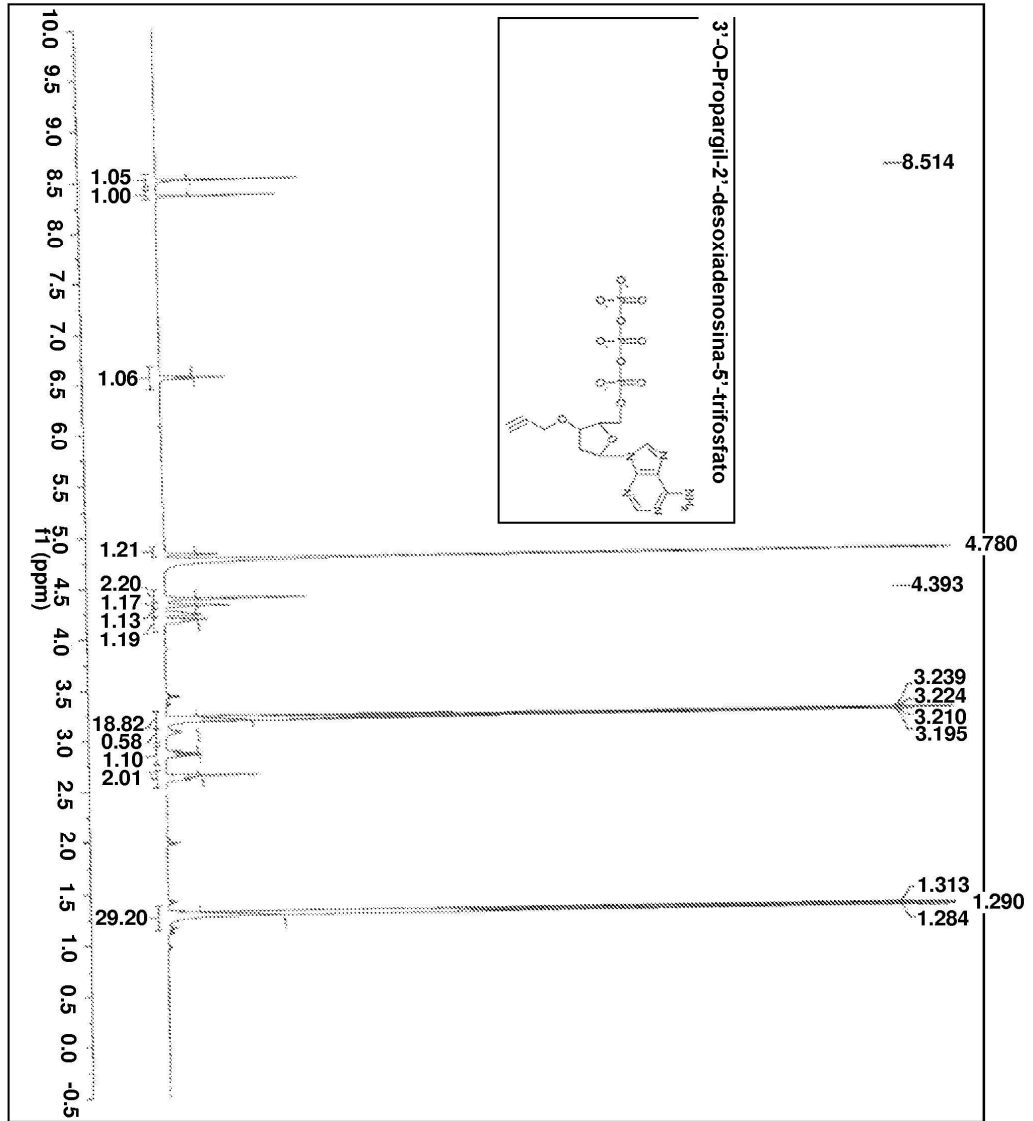
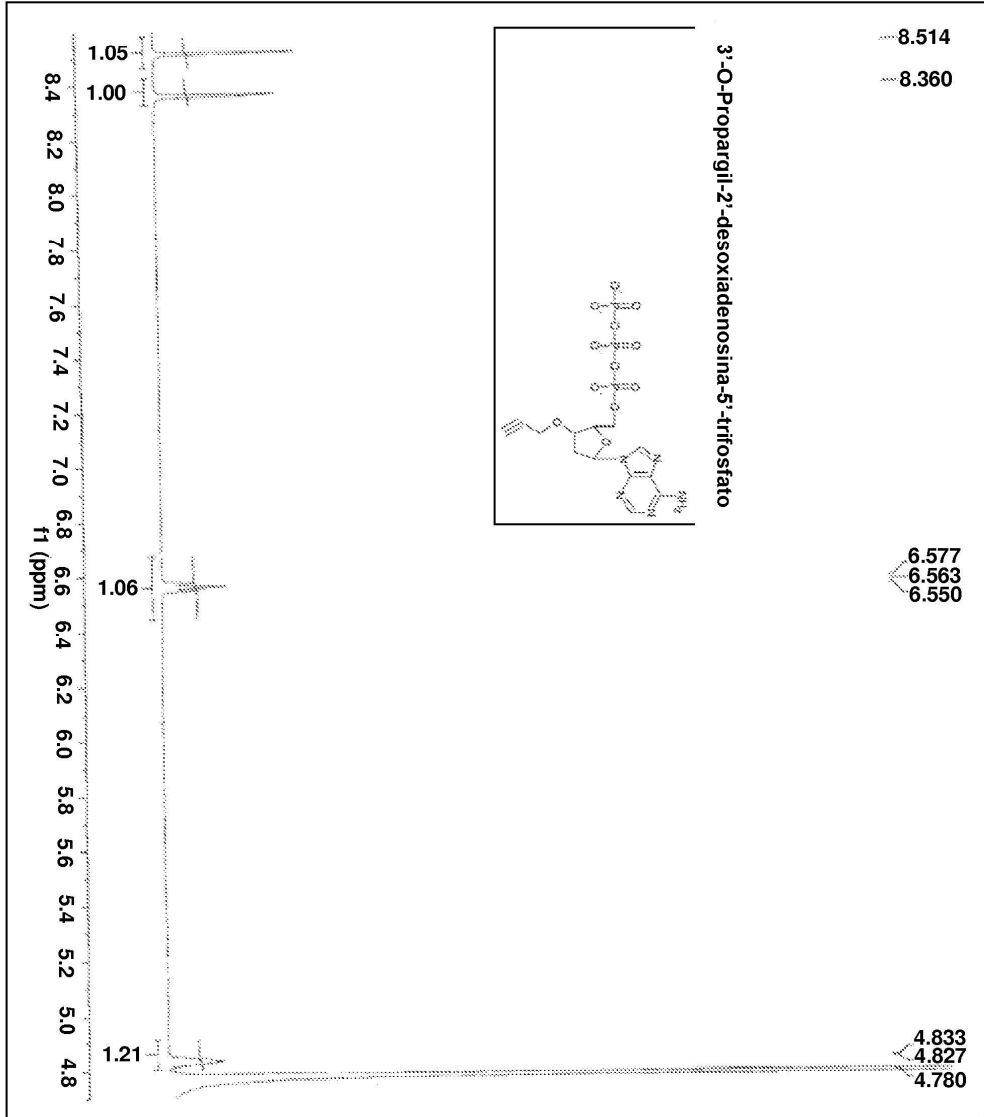


FIG. 5A



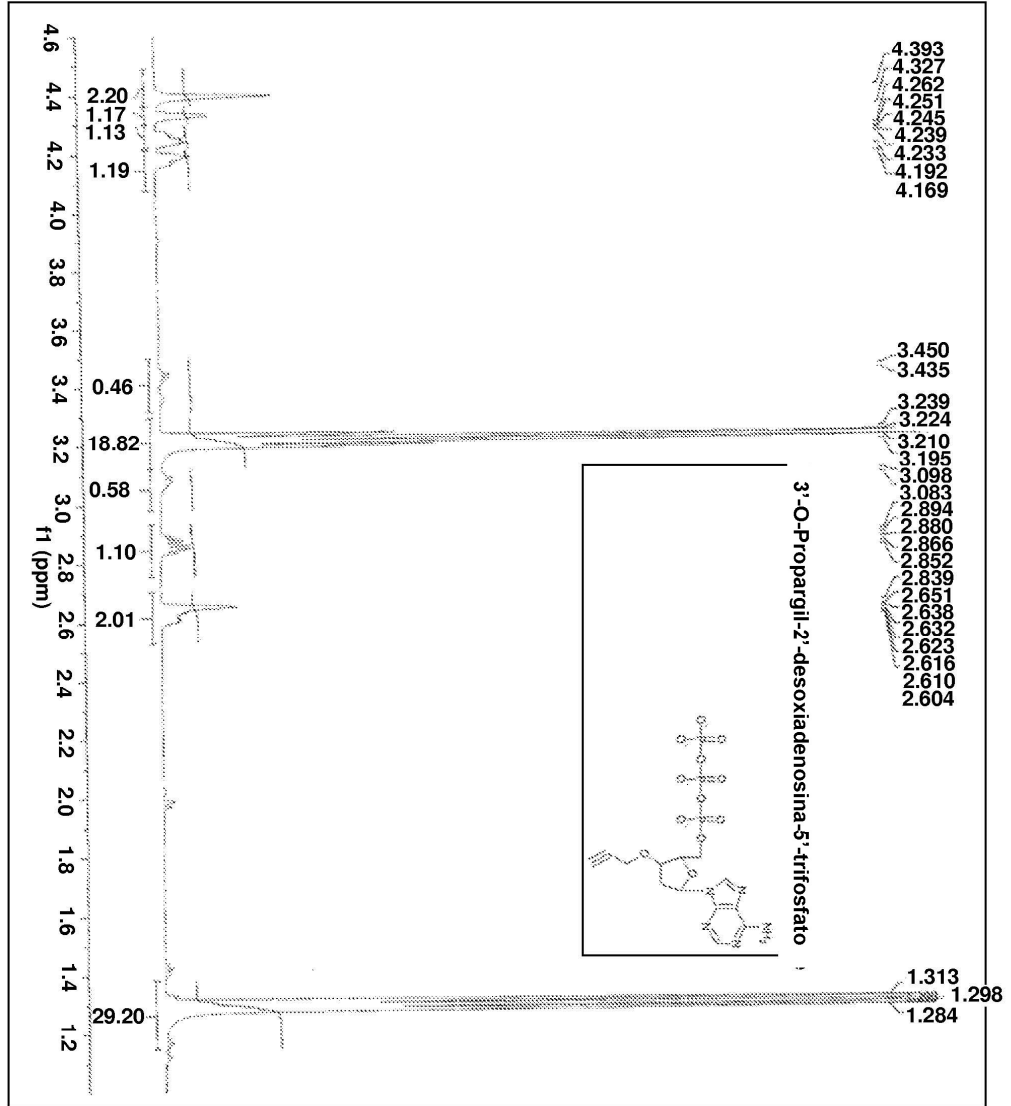


FIG. 5C

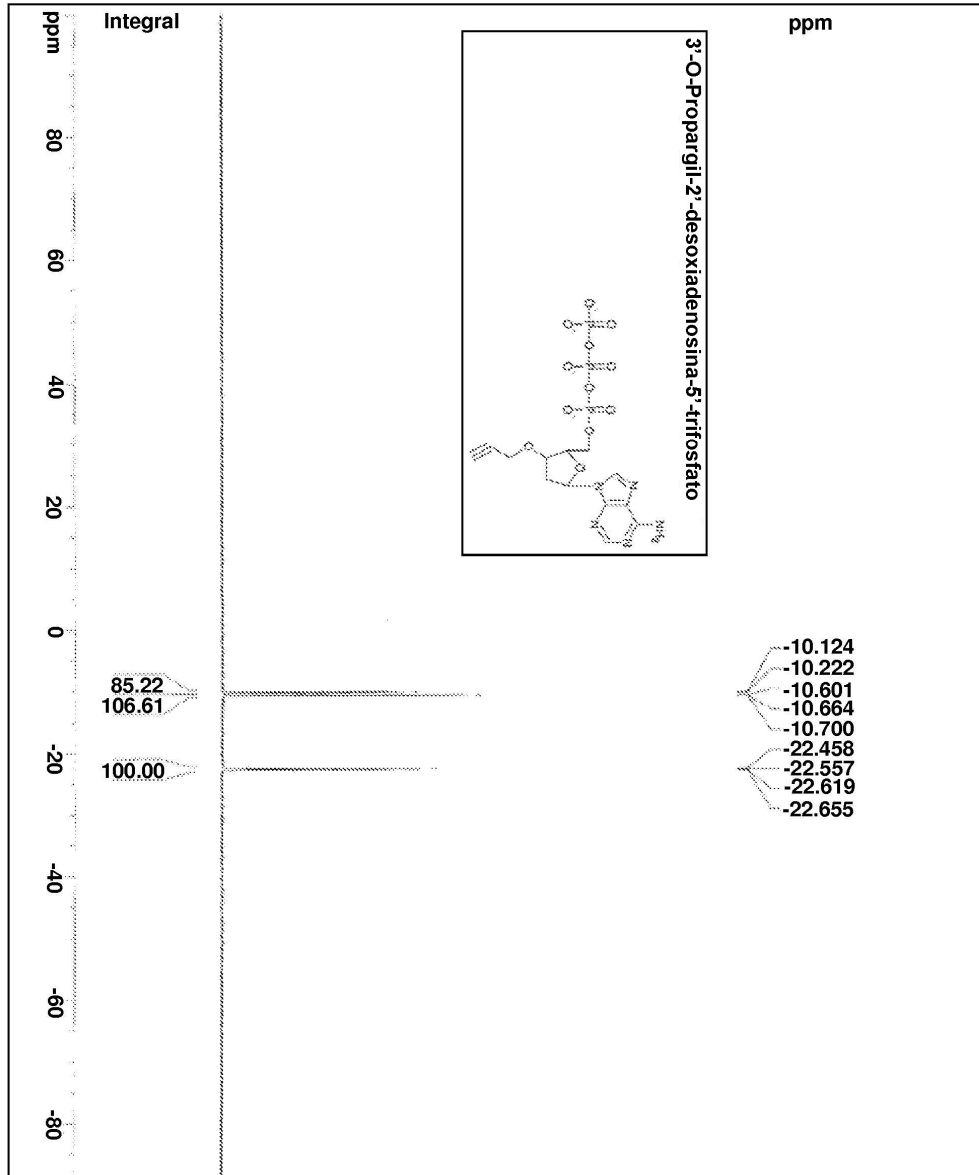


FIG. 5D

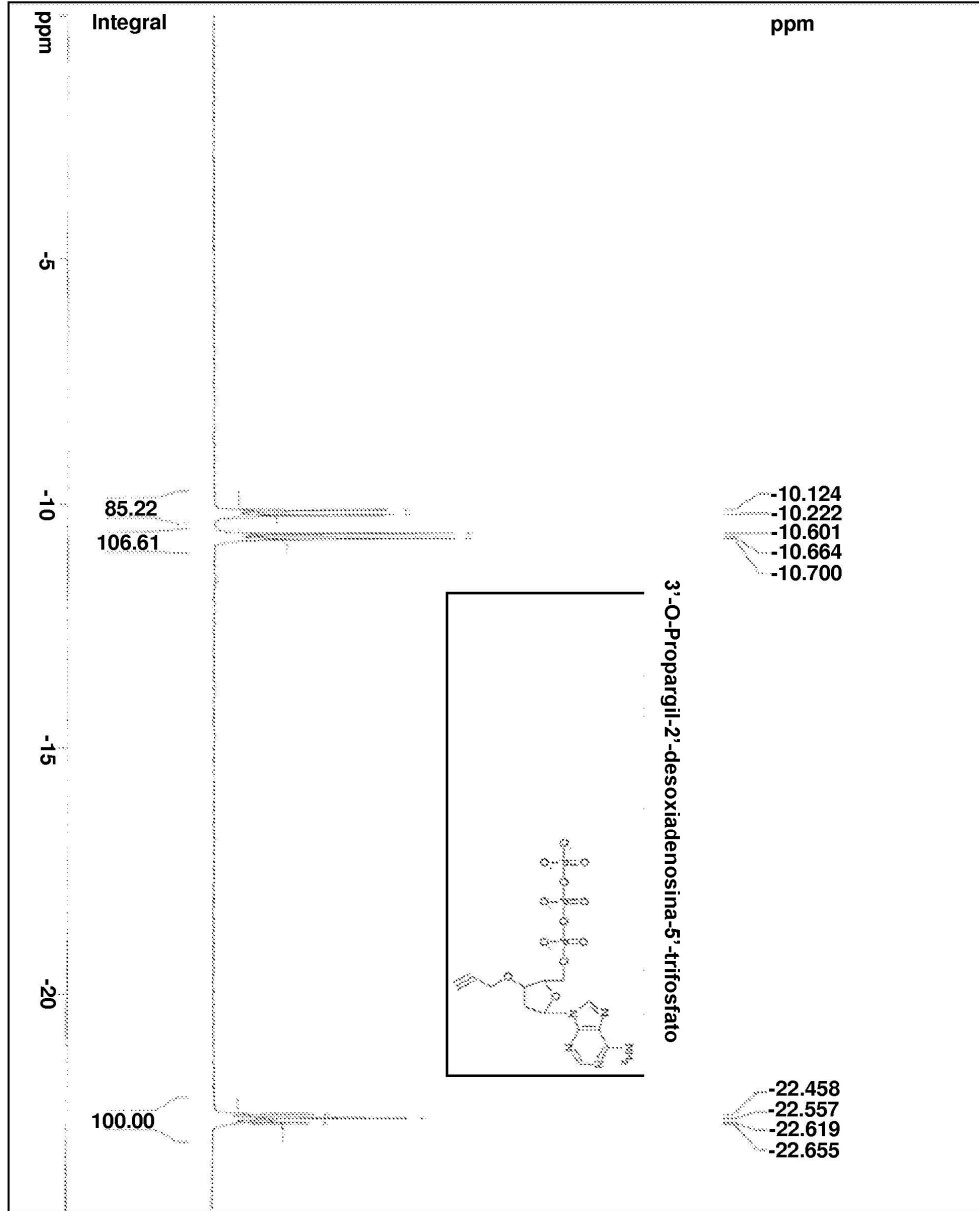


FIG. 5E

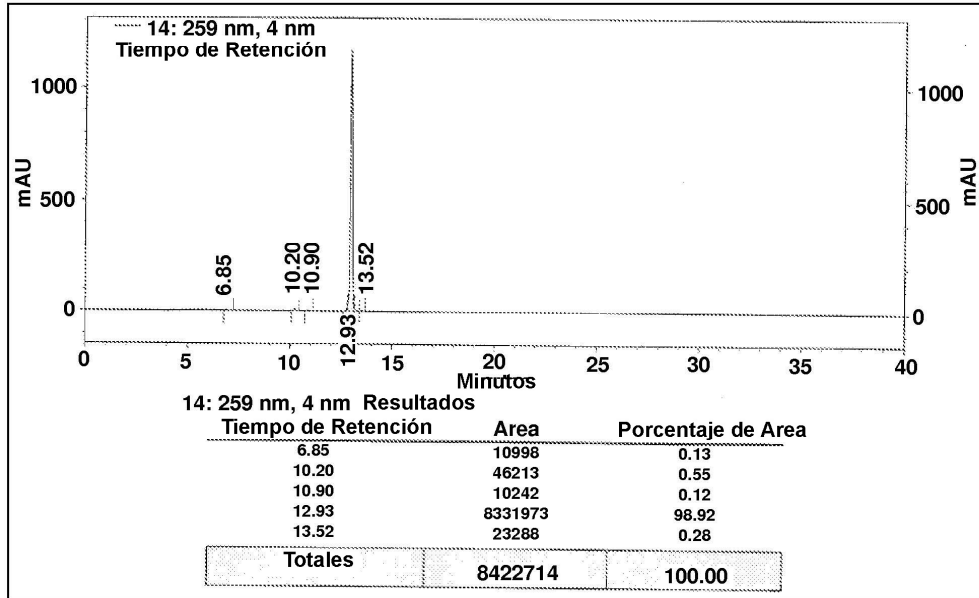


FIG. 5F

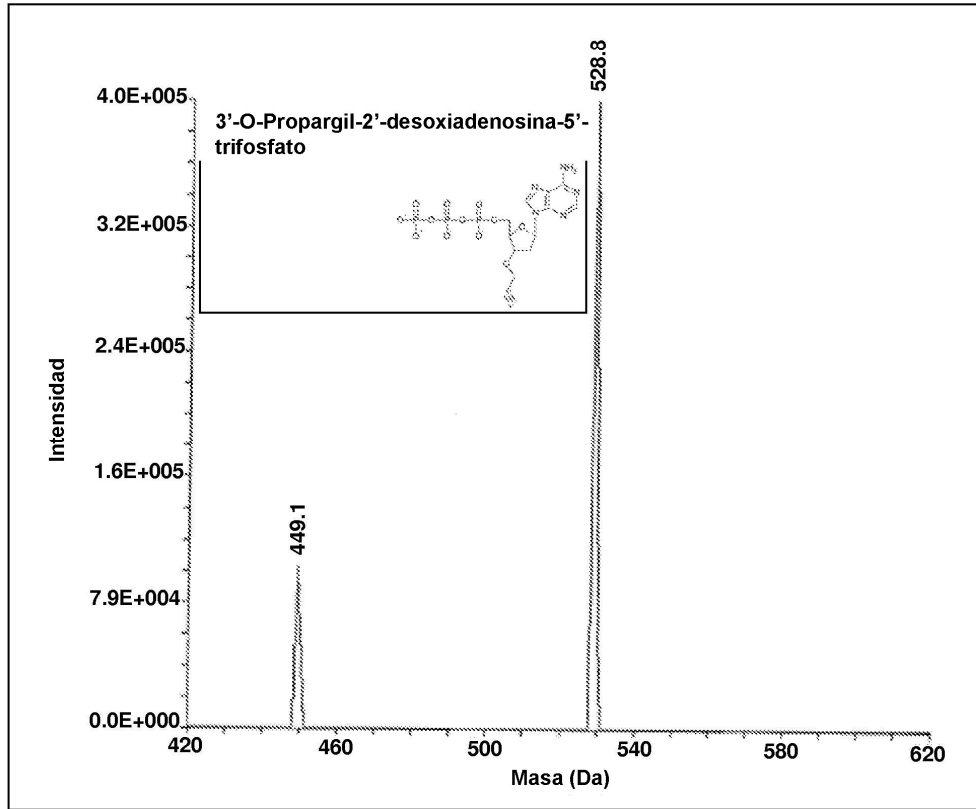


FIG. 5G

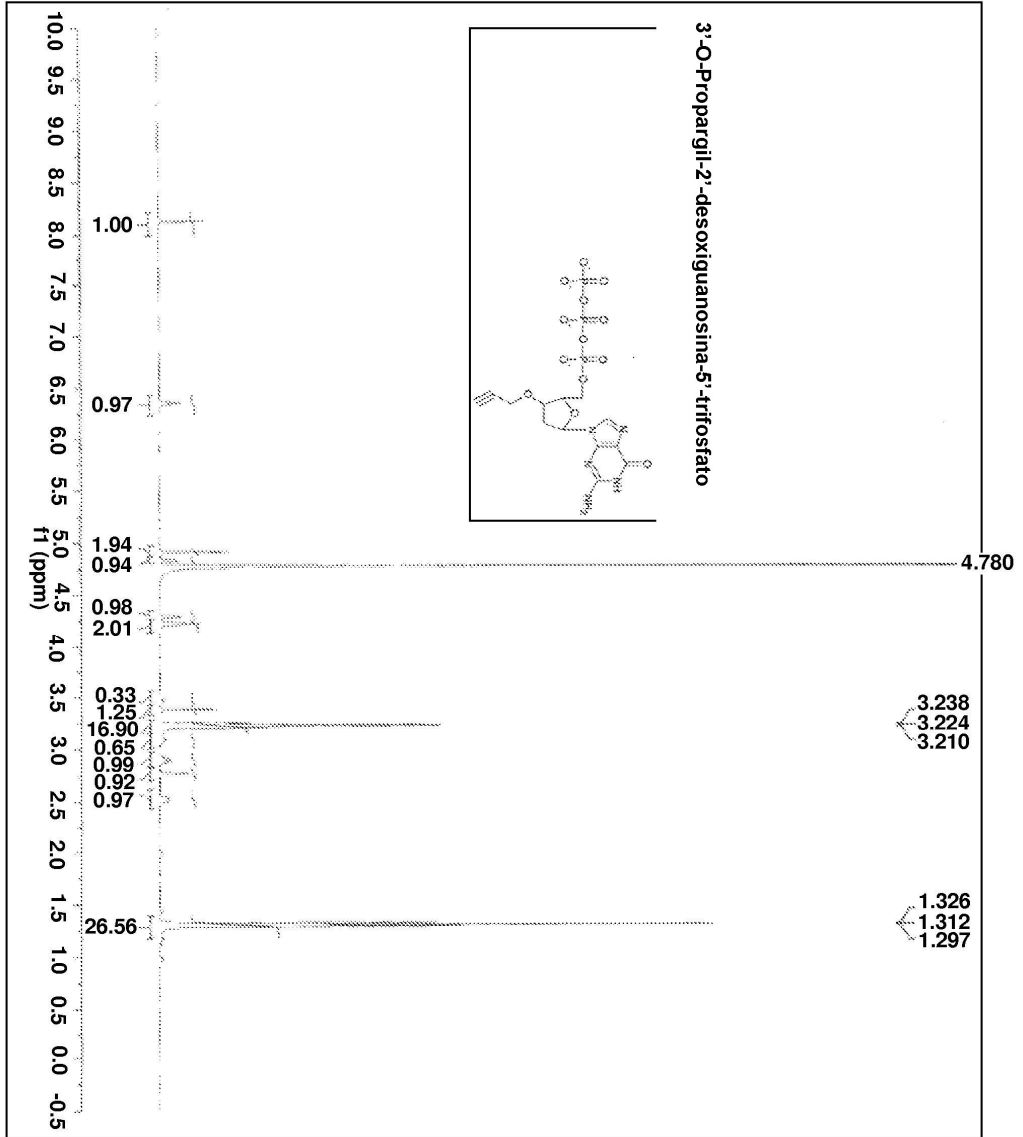


FIG. 6A

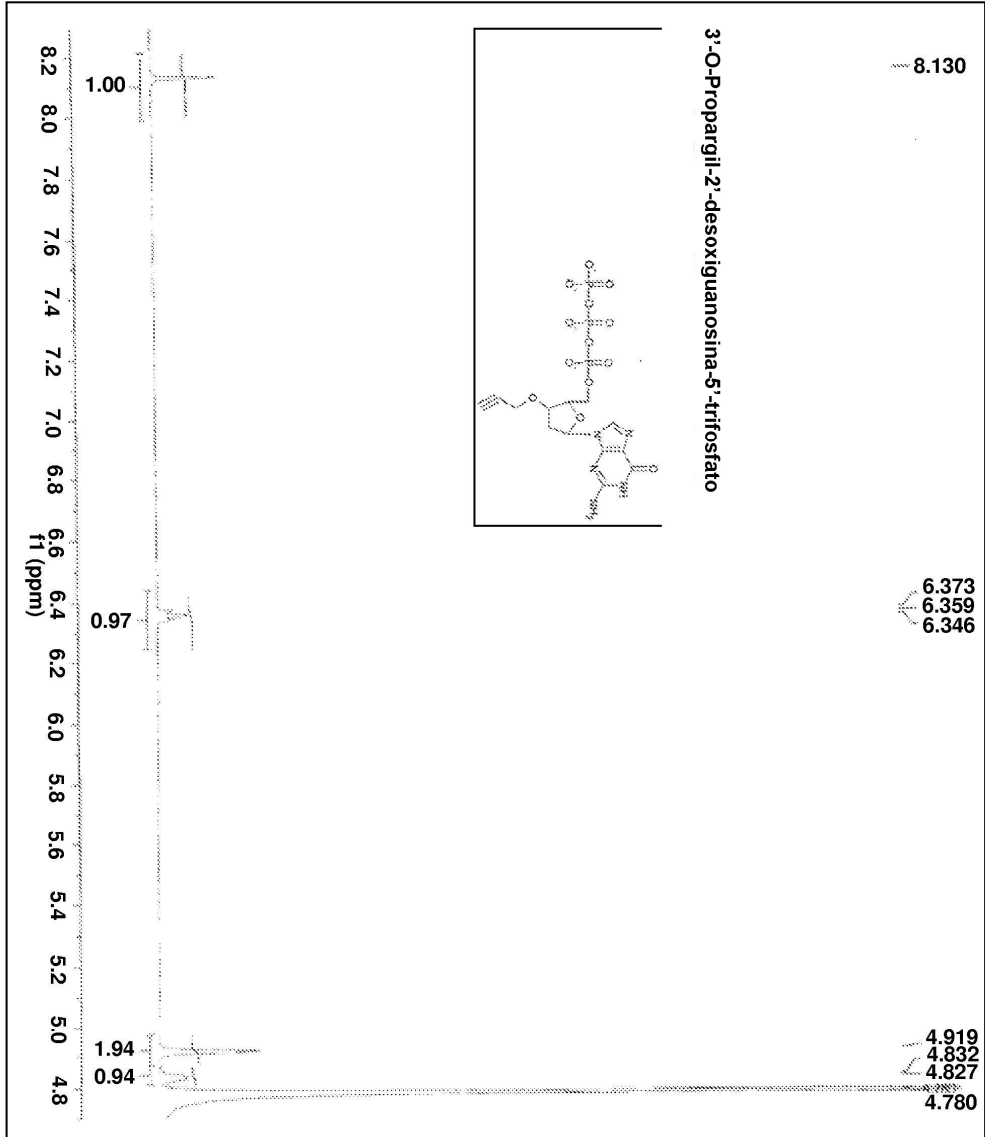


FIG. 6B

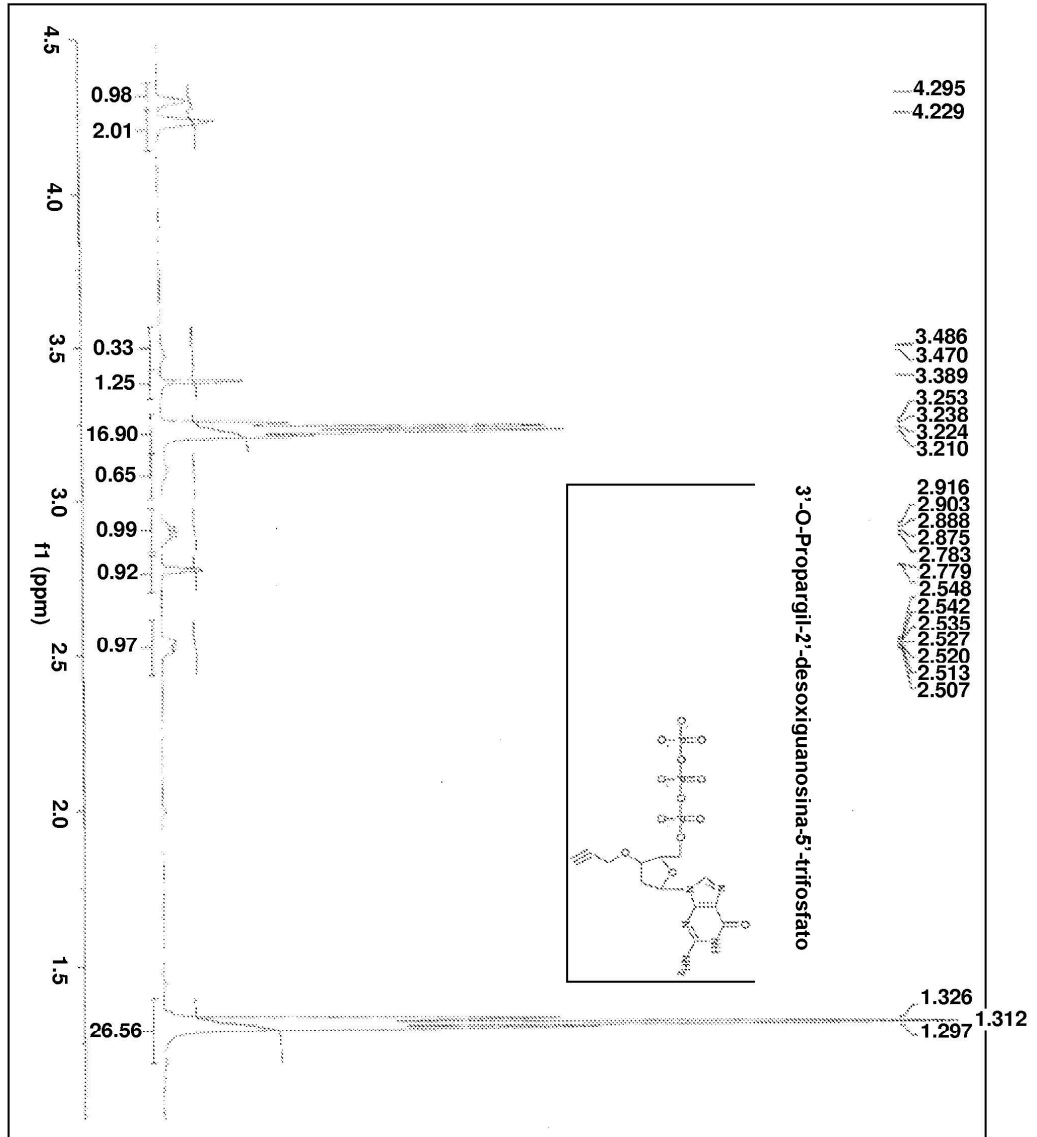


FIG. 6C

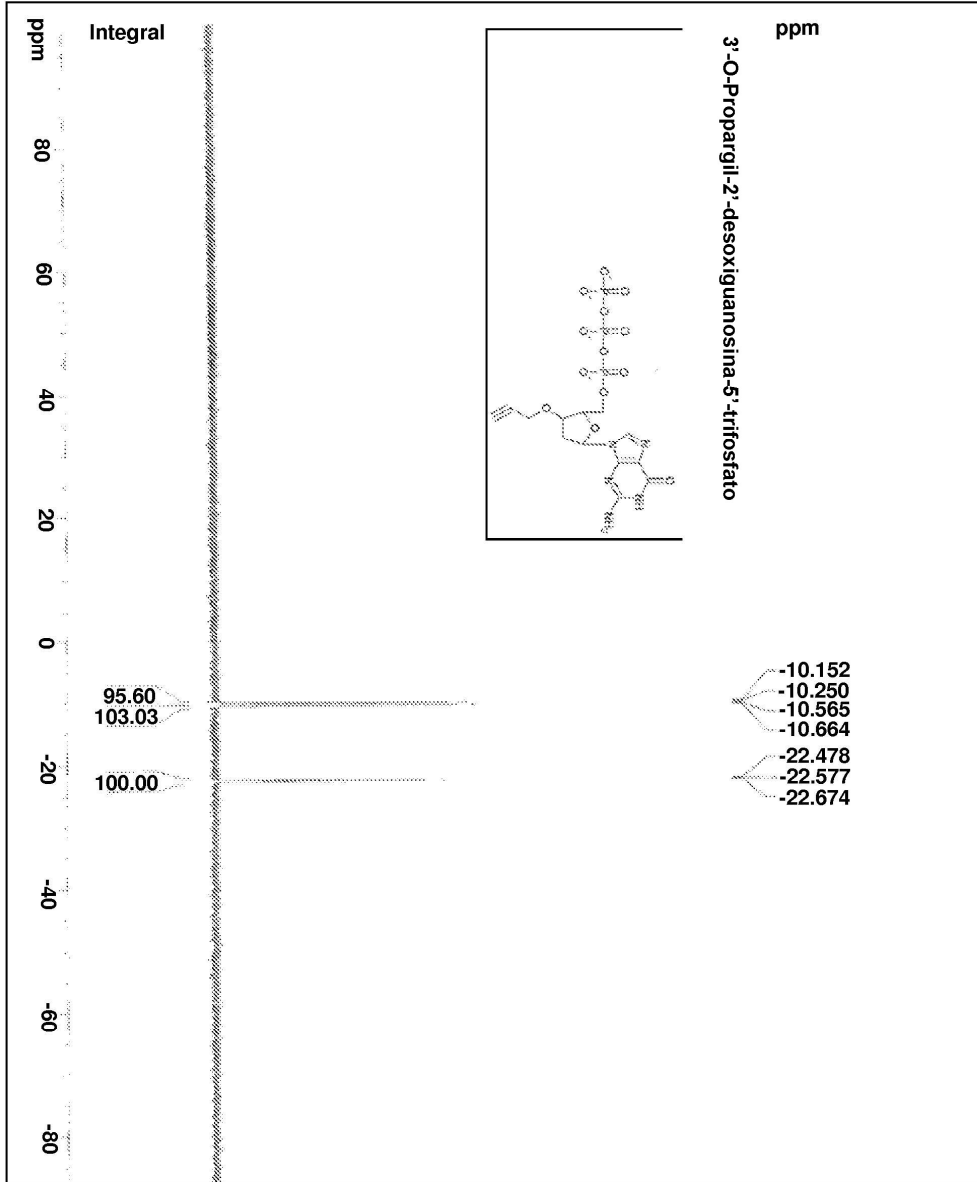


FIG. 6D

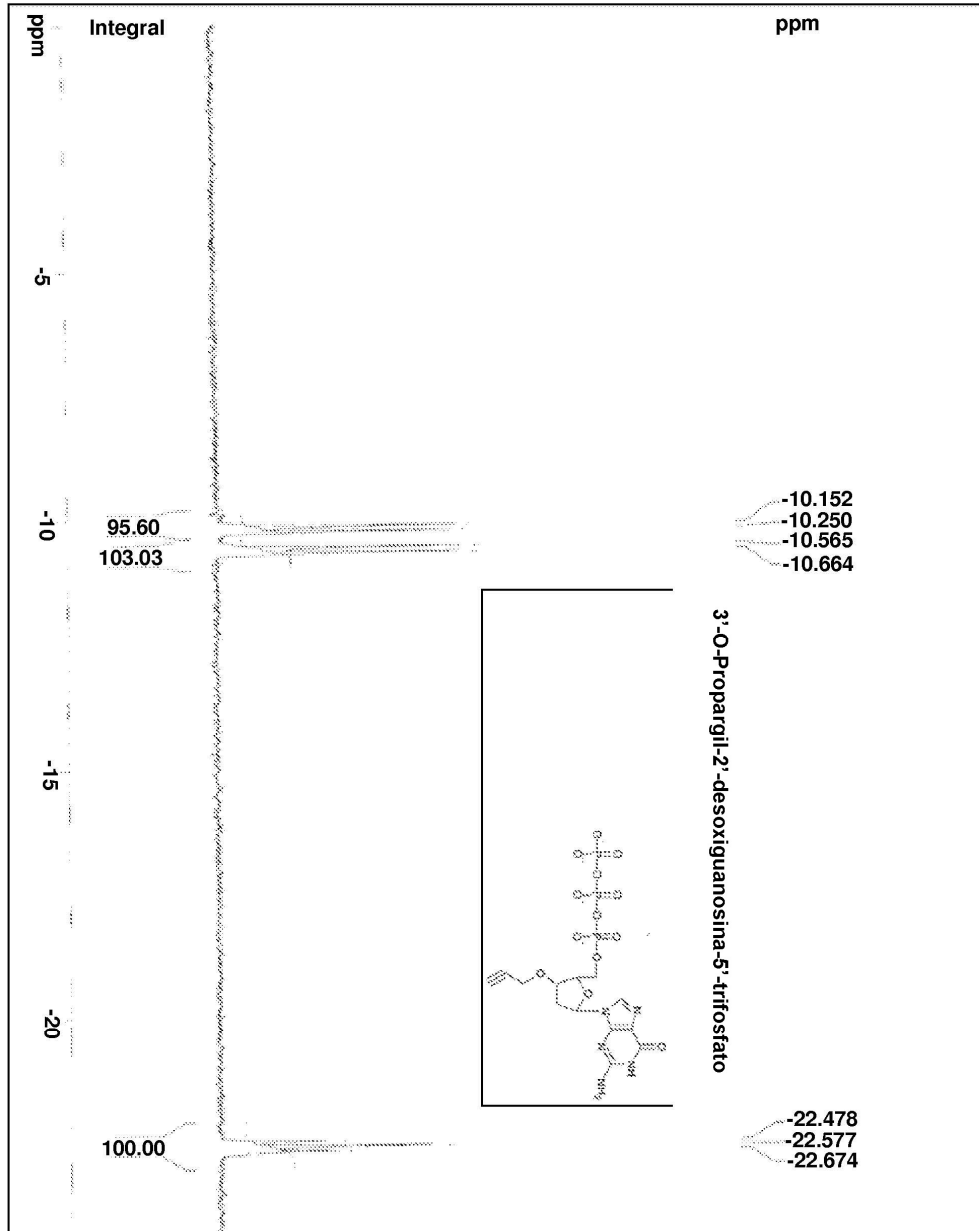


FIG. 6E

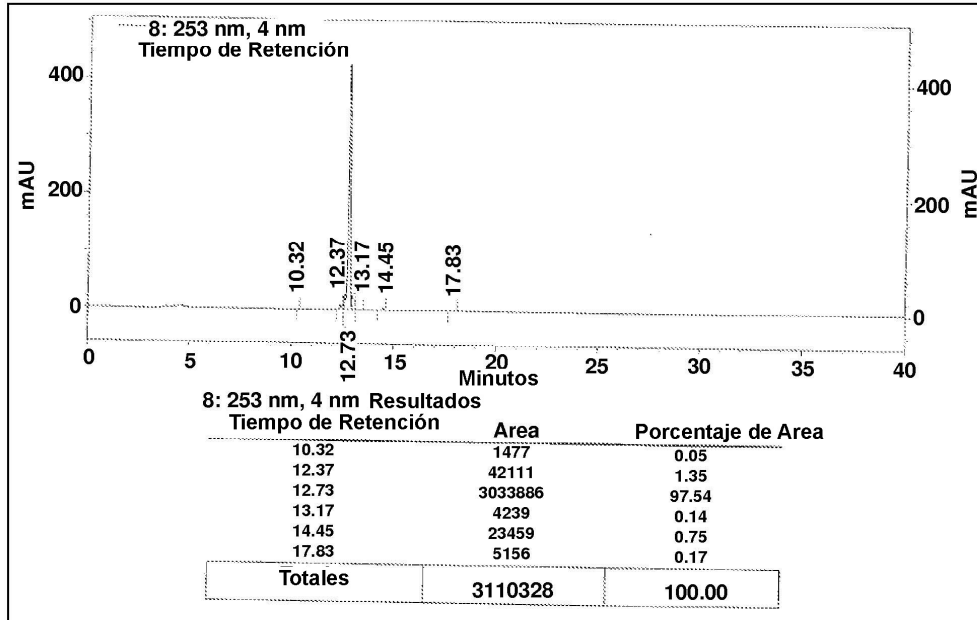


FIG. 6F

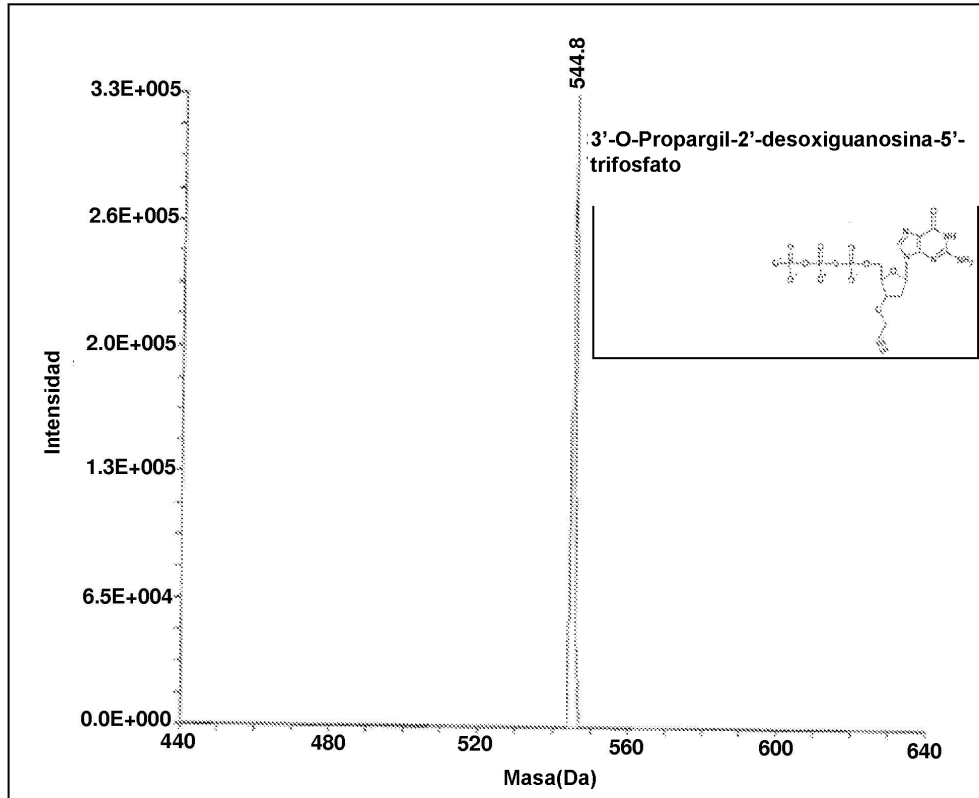


FIG. 6G