



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020000697-1 A2



(22) Data do Depósito: 24/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES REAGENTES MARCADAS DE ALTA INTENSIDADE E MÉTODOS PARA SEQUENCIAMENTO

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68; G01N 21/64; G01N 21/76.

(30) Prioridade Unionista: 24/07/2017 US 62/536,426.

(71) Depositante(es): QUANTUM-SI INCORPORATED.

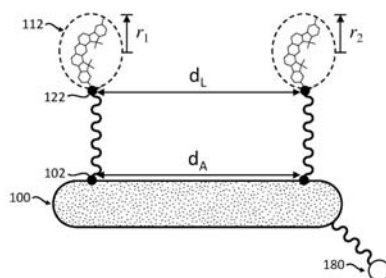
(72) Inventor(es): JONATHAN M. ROTHBERG; JEREMY LACKEY; BRIAN REED; XINGHUA SHI; HAIDONG HUANG; DAVID DODD.

(86) Pedido PCT: PCT US2018043526 de 24/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/023257 de 31/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 13/01/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a composições úteis para a detecção de moléculas únicas em uma amostra. Em alguns aspectos, a descrição fornece um ácido nucleico conectado a um nucleotídeo e dois ou mais marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos aqui descritos compreendem uma ou mais características estruturais que fornecem maior intensidade de fluorescência. Em alguns aspectos, são fornecidos métodos de sequenciamento usando os nucleotídeos marcados da descrição.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES REAGENTES MARCADAS DE ALTA INTENSIDADE E MÉTODOS PARA SEQUENCIAMENTO"**.

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. § 119 (e) para o Pedido de Patente Provisória US. No. 62/536.426, depositado em 24 de julho de 2017, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

CAMPO DA APLICAÇÃO

[002] O presente pedido é genericamente direcionado a composições reagentes marcadas de forma brilhante e métodos de uso das mesmas para a detecção de moléculas únicas.

ANTECEDENTES

[003] Os avanços nas tecnologias de sequenciamento de última geração tornaram possível realizar análises massivamente paralelas de moléculas únicas, o que alterou fundamentalmente o cenário da pesquisa em ciências da vida. Algumas dessas técnicas envolvem o monitoramento de uma reação biológica em tempo real usando componentes de reação luminescentemente marcados. Os marcadores são iluminados com uma fonte de luz para causar luminescência, e a luz luminescente é detectada com um fotodetector. Esses eventos podem ser registrados e analisados para identificar componentes de reação individuais com base nas propriedades de luminescência correspondentes. Ao identificar um tipo específico de molécula marcada dentre uma pluralidade de tipos, é essencial que cada tipo possua propriedades de luminescência únicas e facilmente identificáveis. Além disso, esses parâmetros podem ser determinantes para requisitos instrumentais, tal como a fonte de excitação e o tamanho geral do instrumento.

SUMÁRIO

[004] Aspectos da tecnologia aqui descrita referem-se a componentes de reação marcados compreendendo dois ou mais marcadores luminescentes separados por um ligante (por exemplo, um ligante restrito). Em algumas modalidades, o pedido refere-se à separação de marcadores luminescentes para impedir a atenuação de sinais detectáveis devido à interação marcador - marcador. Em alguns aspectos, o pedido fornece nucleotídeos marcados compreendendo um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante. Em alguns aspectos, o pedido fornece composições, métodos e kits para sequenciar um ácido nucleico modelo.

[005] Em alguns aspectos, o pedido fornece nucleotídeos marcados compreendendo um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o nucleotídeo é configurado para uso como substrato em uma reação de polimerização. Em algumas modalidades, os nucleotídeos marcados do pedido compreendem dois ou mais marcadores luminescentes separados um do outro por uma distância mínima. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente está ao menos 5 angstroms separado de qualquer outro marcador luminescente. Por exemplo, em algumas modalidades, cada marcador luminescente está ao menos 5, ao menos 10, ao menos 15, ao menos 20, ao menos 25, ao menos 30, ao menos 40 ou ao menos 50 angstroms separado de qualquer outro marcador luminescente. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente compreende um centro de massa que está ao menos 5 angstroms separado do centro de massa de qualquer outro marcador luminescente.

[006] Em algumas modalidades, os nucleotídeos marcados do pedido compreendem um ou mais marcadores luminescentes ligados

ao ligante por meio de uma molécula espaçadora. Em algumas modalidades, a molécula espaçadora conecta um marcador luminescente a um sítio de ligação no ligante. Em algumas modalidades, um marcador luminescente é ligado ao ligante por meio de uma molécula espaçadora que compreende ao menos 8 átomos contíguos entre o marcador luminescente e o sítio de ligação no ligante. Em algumas modalidades, a molécula espaçadora compreende menos de 50, menos de 40, menos de 30 ou menos de 20 átomos contíguos entre o marcador luminescente e o sítio de ligação no ligante. Em algumas modalidades, um marcador luminescente é integrado ao ligante.

[007] Em algumas modalidades, o ligante é um oligômero (por exemplo, um ligante oligomérico ou um ligante polimérico). Em algumas modalidades, o oligômero compreende unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende uma pluralidade do mesmo tipo de unidade monomérica (por exemplo, o oligômero é um polímero de um tipo de unidades monoméricas). Em algumas modalidades, o oligômero compreende uma primeira região com uma pluralidade de um primeiro tipo de unidades monoméricas e uma segunda região com uma pluralidade de um segundo tipo de unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende uma pluralidade de regiões diferentes (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais), cada uma compreendendo uma pluralidade de um tipo diferente de unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende ao menos 5 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende ao menos 10 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, o oligômero compreende menos de 150, menos de 100 ou menos de 50 unidades monoméricas (por exemplo, ao menos 5 unidades monoméricas e menos de 200, 150, 100, 75, 50 ou 25

unidades monoméricas; ao menos 10 unidades monoméricas e menos de 200, 150, 100, 75, 50 ou 25 unidades monoméricas).

[008] Em algumas modalidades, quando o ligante é um oligômero (por exemplo, um ligante oligomérico, um ligante polimérico), cada marcador luminescente é separado um do outro por ao menos 5 unidades monoméricas do oligômero. Em algumas modalidades, um primeiro marcador luminescente é integrado ao ligante em uma primeira posição que está ao menos 5 unidades monoméricas separada de uma segunda posição na qual um segundo marcador luminescente é integrado ou ligado ao ligante. Em algumas modalidades, quando os marcadores luminescentes adjacentes são integrados no ligante, os marcadores podem ser separados por menos de 5 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente é ligado ao ligante em um sítio de ligação que está ao menos 5 unidades monoméricas (por exemplo, ao menos 6, ao menos 8, ao menos 10, ao menos 10, ao menos 12, ao menos 14, ao menos 16, ao menos 18, ao menos 20 unidades monoméricas ou mais) separado de qualquer outro sítio de ligação. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente é ligado a um sítio de ligação que está ao menos 5 unidades monoméricas e menos de 40 unidades monoméricas (por exemplo, menos de 38, menos de 36, menos de 34, menos de 32, menos de 30, menos de 28, menos de 26, menos de 24, menos de 22 ou menos de 20 unidades monoméricas) separado de qualquer outro sítio de ligação. Em algumas modalidades, um marcador luminescente é integrado ao ligante entre duas unidades monoméricas sequenciais do oligômero (por exemplo, conectando covalentemente duas unidades monoméricas adjacentes de um oligômero).

[009] Em algumas modalidades, um ligante é suficientemente rígido para impedir interações entre dois ou mais marcadores conec-

tados ao ligante. Em algumas modalidades, a rigidez do ligante é suficiente para preservar ao menos 75%, ao menos 80%, ao menos 85%, ao menos 90%, ao menos 95%, por exemplo, 95 a 100% (por exemplo, cerca de 95%, em torno de 96%, em torno de 97%, em torno de 98%, em torno de 99%, em torno de 100%) da intensidade de cada marcador em relação à sua intensidade quando presente como um único marcador ligado ao mesmo ligante.

[0010] Em algumas modalidades, o ligante é um peptídeo. Em algumas modalidades, a composição de aminoácidos do peptídeo fornece rigidez estrutural (por exemplo, devido à presença de um ou mais segmentos de poliprolina no ligante peptídico). Em algumas modalidades, 90% ou mais (por exemplo, todos) do ligante peptídico consiste de um polímero de poliprolina. Em algumas modalidades, a rigidez do peptídeo é fornecida restringindo o peptídeo por modificação química. Por exemplo, em algumas modalidades, o peptídeo compreende um ou mais segmentos ciclizados. Em algumas modalidades, o peptídeo é um peptídeo ciclizado (por exemplo, um peptídeo com ligação cruzada, um peptídeo ciclizado de ponta a ponta, etc.). Em algumas modalidades, rigidez peptídica suficiente pode ser fornecida incorporando uma combinação de um ou mais segmentos poliméricos de aminoácidos rígidos e um ou mais segmentos poliméricos de aminoácidos modificados quimicamente.

[0011] Em algumas modalidades, o ligante é um polissacarídeo (por exemplo, heparina, sulfato de heparina, poliglicose, polilactose, aminoglicosídeos, N-acetilaminoglicosídeos, e combinações dos mesmos).

[0012] Em algumas modalidades, o ligante é um ácido nucleico. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende um ácido desoxirribonucleico (DNA), um ácido ribonucleico (RNA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico bloqueado (LNA), ou um

derivado dos mesmos. Em algumas modalidades, rigidez suficiente é fornecida usando um ou mais segmentos de ácido nucleico de fita dupla (por exemplo, separando dois ou mais marcadores diferentes). Em algumas modalidades, rigidez suficiente é fornecida por uma ou mais modificações químicas de um ácido nucleico (por exemplo, de um ácido nucleico de fita simples ou fita dupla, ou de um ácido nucleico compreendendo uma ou mais fitas simples e um ou mais segmentos de fita dupla). Em algumas modalidades, um ácido nucleico compreende uma combinação de um ou mais segmentos de fita dupla e um ou mais segmentos quimicamente modificados.

[0013] Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma combinação de um ou mais segmentos de fita simples e um ou mais segmentos de fita dupla. Um segmento de fita simples pode, em algumas modalidades, estar presente na forma de uma alça (por exemplo, como em uma estrutura secundária haste – alça descrita em outra parte deste documento). Em algumas modalidades, um segmento de fita simples está presente na forma de uma região não pareada dentro de um segmento de fita dupla. Por exemplo, uma alça interna pode se formar dentro de um segmento de fita dupla, em que uma ou mais bases de uma fita não formam interações de pareamento de bases com uma ou mais bases adjacentes da outra fita. Um outro exemplo de uma região não pareada inclui alças de abaulamento, que podem se formar dentro de segmentos de fita dupla, em que uma fita inclui uma ou mais bases adicionais em relação à outra fita. Em algumas modalidades, regiões de fita simples e regiões de fita dupla conferem rigidez estrutural.

[0014] Em algumas modalidades, uma região de fita simples (por exemplo, uma região não pareada) tem ao menos 2 bases de comprimento (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 bases ou mais de comprimento). Em algumas modalidades, uma região de fita simples

tem entre 2 e 10 bases de comprimento (por exemplo, entre 2 e 8, entre 4 e 10, ou entre 4 e 8, bases de comprimento). Em algumas modalidades, uma região de fita dupla tem entre 2 e 40 bases de comprimento (por exemplo, entre 2 e 20, entre 2 e 10, entre 10 e 40, entre 10 e 30, entre 10 e 30, entre 10 e 20, entre 20 e 40, ou entre 20 e 30 bases de comprimento).

[0015] Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma primeira fita de oligonucleotídeo acoplada aos dois ou mais marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, os dois ou mais marcadores luminescentes são acoplados em dois ou mais sítios de ligação na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente compreende um volume estérico tendo um ponto central que está ao menos 5 angstroms separado de qualquer outro marcador luminescente. Por exemplo, em algumas modalidades, cada marcador luminescente compreende um volume estérico tendo um ponto central que está ao menos 6 angstroms, entre cerca de 5 a 10 angstroms, entre cerca de 6 a 10 angstroms, entre cerca de 6 a 10 angstroms, entre cerca de 10 a 15 angstroms, entre cerca de 15 a 20 angstroms, entre cerca de 20 a 25 angstroms, ou entre cerca de 25 a 50 angstroms separado de qualquer outro marcador luminescente.

[0016] Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende ainda uma segunda fita de oligonucleotídeo hibridizada com a primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo está ligada a um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato). Em algumas modalidades, a segunda fita de oligonucleotídeo está ligada a um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato).

[0017] Em algumas modalidades, os dois ou mais sítios de ligação são separados um do outro por ao menos 5 bases (por exemplo, ao

menos 5 nucleotídeos) na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, os dois ou mais sítios de ligação são separados um do outro por ao menos 5 e menos de 40 bases (por exemplo, entre cerca de 5 e 30 bases, entre cerca de 5 e 20 bases, entre cerca de 5 e 20 bases, entre cerca de 5 e 10 bases, entre cerca de 10 e 40 bases, entre cerca de 20 e 40 bases, ou entre cerca de 30 e 40 bases) na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, cada sítio de ligação está ao menos 2 bases separado de uma guanina ou uma citosina na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, cada sítio de ligação ocorre em um local abásico na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, cada sítio de ligação ocorre em uma nucleobase de um nucleotídeo na primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a nucleobase é selecionada a partir de uma nucleobase A, T ou U.

[0018] Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo forma um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou mais) hastes - alças. Em algumas modalidades, uma região de alça de cada haste - alça compreende um sítio de ligação dos dois ou mais sítios de ligação. Em algumas modalidades, a região de alça de cada haste - alça compreende ao menos 4 bases não pareadas (por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8 bases não pareadas ou mais). Em algumas modalidades, a região de alça compreende uma sequência (por exemplo, uma sequência de nucleotídeos) tendo menos de 33% de conteúdo de G/C.

[0019] Em alguns aspectos, os nucleotídeos marcados da descrição compreendem um ligante de ácido nucleico compreendendo uma primeira fita de oligonucleotídeo ligada a duas ou mais fitas de oligonucleotídeo ramificadas em uma extremidade terminal da primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo é ligada às duas ou mais fitas de oligonucleotídeo ramificadas por meio de um composto de acoplamento covalente. Em

acoplamento covalente. Em algumas modalidades, ao menos uma das três ou mais fitas de oligonucleotídeo está ligada a um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato). Em algumas modalidades, o primeiro componente de oligonucleotídeo é hibridizado com um segundo componente de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, o segundo componente de oligonucleotídeo compreende ao menos uma fita de oligonucleotídeo ligada a um marcador luminescente.

[0022] Em algumas modalidades, os nucleotídeos marcados da descrição são luminescentemente marcados com um corante fluorescente. Em algumas modalidades, o corante fluorescente é um corante de rodamina, um corante BODIPY, ou um corante de cianina.

[0023] Em algumas modalidades, os nucleotídeos marcados da descrição compreendem um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) que está ao menos 1 nm separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, o nucleotídeo está separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes entre aproximadamente 1 e 10 nm (por exemplo, entre aproximadamente 2 e 10 nm, entre aproximadamente 4 e 10 nm, entre aproximadamente 6 e 10 nm, ou entre aproximadamente 8 e 10 nm). Em algumas modalidades, o nucleotídeo está separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes entre aproximadamente 2 e 20 nm (por exemplo, entre aproximadamente 6 e 20 nm, entre aproximadamente 10 e 20 nm, entre aproximadamente 12 e 20 nm, ou entre aproximadamente 16 e 20 nm).

[0024] Em alguns aspectos, a descrição fornece métodos para determinar a sequência de um ácido nucleico modelo. Em algumas modalidades, os métodos incluem uma etapa compreendendo expor um complexo em um volume alvo, o complexo compreendendo o ácido nucleico modelo, um iniciador, e uma enzima de polimerização, a uma

pluralidade de tipos de nucleotídeos luminescentemente marcados fornecidos pelo pedido. Em algumas modalidades, um ou mais da pluralidade de tipos de nucleotídeos luminescentemente marcados compreendem um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o ligante é um oligômero que compreende ao menos 10 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente é ligado ao ligante em um sítio de ligação que está ao menos 5 unidades monoméricas separado de qualquer outro sítio de ligação. Por exemplo, em algumas modalidades, um sítio de ligação é separado de qualquer outro sítio de ligação por entre cerca de 5 e 30 unidades monoméricas, entre cerca de 5 e 20 unidades monoméricas, entre cerca de 5 e 10 unidades monoméricas, entre cerca de 10 e 40 unidades monoméricas, entre cerca de 20 e 40 unidades monoméricas ou entre cerca de 30 e 40 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente está ao menos 5 angstroms separados de qualquer outro marcador luminescente. Por exemplo, em algumas modalidades, cada marcador luminescente está separado de qualquer outro marcador luminescente por aproximadamente 5 a 10 angstroms, aproximadamente 6 a 10 angstroms, aproximadamente 10 a 15 angstroms, aproximadamente 15 a 20 angstroms, aproximadamente 15 a 20 angstroms, aproximadamente 20 a 25 angstroms, ou aproximadamente 25 a 50 angstroms. Por conseguinte, em alguns aspectos, a descrição fornece métodos de sequenciamento de ácidos nucleicos que utilizam qualquer um dos nucleotídeos luminescentemente marcados aqui descritos.

[0025] Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda uma etapa de direcionar uma série de pulsos de uma ou mais energias de excitação em direção a uma vizinhança do volume alvo. Em

algumas modalidades, os métodos compreendem ainda uma etapa de detectar uma pluralidade de fótons emitidos a partir de nucleotídeos luminescentemente marcados durante a incorporação sequencial em um ácido nucleico compreendendo o iniciador. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda uma etapa de identificar a sequência de nucleotídeos incorporados, determinando o tempo e, opcionalmente, a intensidade de luminescência e/ou o brilho dos fótons emitidos.

[0026] Em algumas modalidades, quatro tipos diferentes de nucleotídeos (por exemplo, adenina, guanina, citosina, timina/uracila) em uma mistura reacional podem ser marcados com uma ou mais moléculas luminescentes (por exemplo, tendo dois ou mais marcadores luminescentes, como aqui descrito). Em algumas modalidades, cada tipo de nucleotídeo pode ser conectado a mais de uma da mesma molécula luminescente (por exemplo, dois ou mais do mesmo corante fluorescente conectado a um nucleotídeo). Em algumas modalidades, cada molécula luminescente pode ser conectada a mais de um nucleotídeo (por exemplo, dois ou mais do mesmo nucleotídeo). Em algumas modalidades, mais de um nucleotídeo pode ser conectado (por exemplo, através de um ligante aqui descrito) a mais de uma molécula luminescente.

[0027] Em algumas modalidades, os marcadores luminescentes entre um conjunto de quatro nucleotídeos podem ser selecionados a partir de corantes que compreendem um composto aromático ou heteroaromático e podem ser um pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, benzindol, oxazol, carbazol, tiazol, benzotiazol, fenantridina, fenoxazina, porfirina, quinolina, etídio, benzamida, cianina, carbocianina, salicilato, antranilato, cumarina, fluoresceína, rodamina ou outro composto similar. Exemplos de corantes incluem corantes de xanteno, tal como corantes de fluoresceína ou rodamina,

corantes de naftaleno, corantes de cumarina, corantes de acridina, corantes de cianina, corantes de benzoxazol, corantes de estilbeno, corantes de pireno, corantes de ftalocianina, corantes de ficobiliproteína, corantes de esquaraína, corantes BODIPY, e similar.

[0028] Em alguns aspectos, o pedido fornece kits para sequenciar um ácido nucleico modelo. Em algumas modalidades, um kit compreende uma pluralidade de tipos de nucleotídeos luminescentemente marcados, como aqui descrito. Em algumas modalidades, cada tipo de nucleotídeo marcado compreende dois ou mais marcadores luminescentes ligados a um ou mais nucleotídeos (por exemplo, um ou mais nucleosídeo polifosfatos) através de um ligante. Em algumas modalidades, o kit compreende ainda uma enzima de polimerização. Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um iniciador complementar ao ácido nucleico modelo que está sendo sequenciado.

[0029] Em alguns aspectos, o pedido fornece composições de reação de sequenciamento de ácido nucleico. Em algumas modalidades, as composições compreendem dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4 ou mais) tipos diferentes de nucleotídeos luminescentemente marcados em uma mistura reacional. Em algumas modalidades, cada tipo de nucleotídeo luminescentemente marcado compreende um nucleotídeo marcado de acordo com o presente pedido. Em algumas modalidades, as composições compreendem ainda uma enzima de polimerização. Em algumas modalidades, as composições compreendem ainda um ácido nucleico modelo. Em algumas modalidades, as composições compreendem ainda um iniciador complementar ao ácido nucleico modelo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0030] O versado na técnica entenderá que as figuras, descritas aqui, são apenas para fins ilustrativos. Entende-se que, em alguns casos, vários aspectos da invenção podem ser mostrados exagerados

ou ampliados para facilitar uma compreensão da invenção. Nos desenhos, caracteres de referência similar geralmente se referem a características similares, elementos funcionalmente similares e/ou estruturalmente similares ao longo das várias figuras. Os desenhos não estão necessariamente em escala, enfatizando a ilustração dos princípios dos ensinamentos. Os desenhos não pretendem limitar o escopo dos presentes ensinamentos de forma alguma.

[0031] As características e vantagens da presente invenção tornar-se-ão mais evidentes a partir da descrição detalhada apresentada abaixo quando tomadas em conjunto com os desenhos.

[0032] Ao descrever modalidades em referência aos desenhos, referências de direção ("acima", "abaixo", "superior", "inferior", "esquerda", "direita", "horizontal", "vertical," etc.) pode ser usado. Tais referências são destinadas apenas como uma ajuda para o leitor visualizar os desenhos em uma orientação normal. Essas referências direcionais não são destinadas a descrever uma orientação preferencial ou única de um dispositivo incorporado. Um dispositivo pode ser incorporado em outras orientações.

[0033] Como está evidente a partir da descrição detalhada, os exemplos representados nas figuras (por exemplo, Figuras 1 a 10) e adicionalmente descritos para fins de ilustração ao longo do pedido descrevem modalidades não limitantes e, em alguns casos, podem simplificar certos processos ou omitir recursos ou etapas para fins de ilustração mais clara.

[0034] A Figura 1A é um diagrama que descreve genericamente a separação de marcador luminescente em um reagente brilhantemente marcado.

[0035] A Figura 1B representa estruturas de ligantes genéricas com diferentes configurações de ligação de marcador luminescente.

[0036] A Figura 2A é um diagrama que descreve genericamente

um ligante de ácido nucleico ligado a dois marcadores luminescentes.

[0037] A Figura 2B representa ácidos nucleicos genéricos tendo configurações de fitas diferentes (em cima) e um diagrama que descreve genericamente a ocupação espacial do marcador luminescente (embaixo).

[0038] A Figura 2C representa ácidos nucleicos genéricos tendo diferentes sítios de ligação de marcador relativos (em cima) e diferentes conectividades de reagentes (embaixo).

[0039] A Figura 3A representa ácidos nucleicos genéricos que conectam marcadores a um reagente por meio da mesma conectividade da fita de oligonucleotídeo (esquerda) ou oposta (direita).

[0040] A Figura 3B representa ácidos nucleicos genéricos com exemplos de restrições de tamanho aproximadas que podem ser usadas no modelo de reagentes brilhantemente marcados.

[0041] A Figura 3C é uma estrutura exemplificativa de um ácido nucleico conectando dois marcadores luminescentes a um nucleosídeo polifosfato via conectividade de mesma fita.

[0042] A Figura 3D representa um exemplo de uma reação de sequenciação que confirmou que um ligante de ácido nucleico em forma de bastonete (por exemplo, como mostrado na Figura 3C) pode ser usado para detectar a incorporação de um nucleosídeo polifosfato marcado.

[0043] A Figura 3E é uma estrutura exemplificativa de um ácido nucleico conectando dois marcadores luminescentes a um nucleosídeo polifosfato via conectividade de fita oposta.

[0044] A Figura 3F é uma estrutura exemplificativa de um ligante de ácido nucleico com marcadores luminescentes integrados em uma fita de oligonucleotídeo.

[0045] A Figura 3G representa um exemplo de uma reação de sequenciação que foi conduzida usando os quatro construtos diferen-

tes de ligante de ácido nucleico mostrados.

[0046] A Figura 4A representa ligantes de ácido nucleico genéricos tendo uma única estrutura secundária de haste - alça.

[0047] A Figura 4B representa ligantes de ácido nucleico genéricos tendo múltiplas estruturas secundárias de haste - alça.

[0048] A Figura 4C é uma estrutura exemplificativa de um ligante de ácido nucleico tendo marcadores luminescentes anexados a alças de estruturas secundárias de haste - alça separadas.

[0049] A Figura 4D representa um exemplo de uma reação de sequenciação que confirmou que um nucleosídeo polifosfato marcado com um ligante de ácido nucleico de haste - alça (por exemplo, como mostrado na Figura 4C) pode ser usado para detectar a incorporação de um nucleosídeo polifosfato.

[0050] A Figura 5A representa genericamente ligantes de ácido nucleico em forma de árvore tendo fitas de oligonucleotídeo ramificadas ligadas aos marcadores luminescentes.

[0051] A Figura 5B é um exemplo de um ligante de ácido nucleico em forma de árvore tendo marcadores luminescentes ligados nas extremidades terminais de fitas de oligonucleotídeos ramificadas separadas.

[0052] A Figura 6A descreve genericamente ligantes de ácido nucleico em forma de estrela e fornece um exemplo de restrições de tamanho aproximadas que podem ser usadas no projeto de ligantes de ácido nucleico em forma de estrela.

[0053] A Figura 6B é uma estrutura exemplificativa de um ligante de ácido nucleico em forma de estrela.

[0054] A Figura 6C é uma estrutura exemplificativa de um ligante de ácido nucleico tendo um núcleo tetraédrico.

[0055] A Figura 6D representa um exemplo de um esquema de reação que pode ser usado para sintetizar um ligante de ácido

nucleico tendo um núcleo tetraédrico.

[0056] A Figura 6E representa genericamente uma estrutura de ligação de ácido nucleico de base tetraédrica tendo marcadores luminescentes ligados em junções de três vias.

[0057] A Figura 7 descreve genericamente um processo de geração de um ligante de ácido nucleico à base de ciclodextrina tendo marcadores luminescentes ligados em junções de três vias.

[0058] A Figura 8 representa exemplos de estruturas de ligantes de ácido nucleico usados em um conjunto de experimentos para avaliar os efeitos do comprimento do espaçador nas medições da vida útil da fluorescência.

[0059] A Figura 9 representa exemplos de estruturas de ligantes de ácido nucleico usados em um conjunto de experimentos para avaliar os efeitos da restrição de ligante em medições de vida útil da fluorescência.

[0060] A Figura 10 representa exemplos de estruturas de ligantes de ácido nucleico usados em um conjunto de experimentos para avaliar os efeitos do comprimento do espaçador na vida útil da fluorescência em ligantes restritos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0061] Entre outros aspectos, a descrição fornece reagentes luminescentemente marcados compreendendo dois ou mais marcadores, em que os marcadores são configurados para fornecer alta intensidade e/ou características de emissão consistentes (por exemplo, vida útil de emissão consistente). Em algumas modalidades, os dois ou mais marcadores são configurados para evitar interações marcador - marcador que podem reduzir a intensidade ou outras características de emissão das emissões. Em algumas modalidades, os dois ou mais marcadores são configurados para a) evitar interações com um ligante, e/ou b) para cada um ter interações similares com um

ligante.

[0062] Em alguns aspectos, a descrição fornece métodos e composições relacionados a reagentes luminescentemente marcados com alta intensidade de emissão. Em alguns aspectos, a descrição fornece métodos e composições relacionados a reagentes luminescentemente marcados com alto brilho de emissão. Em alguns aspectos, a descrição se refere a reagentes brilhantemente marcados tendo vida útil de emissão consistente. Como usado aqui, em algumas modalidades, "brilho" (e variações dos mesmos, por exemplo, "brilhante", "brilhantemente," etc.) refere-se a um parâmetro que relata a intensidade média de emissão por molécula de reagente marcada. Assim, em algumas modalidades, "intensidade de emissão" pode ser usada para se referir genericamente ao brilho de uma composição compreendendo reagentes brilhantemente marcados. Em algumas modalidades, o brilho de um reagente marcado é igual ao produto de seu rendimento quântico e coeficiente de extinção. Em algumas modalidades, os reagentes marcados da descrição são projetados para maximizar o rendimento quântico e/ou minimizar os valores do coeficiente de extinção para promover o aumento do brilho.

[0063] Os reagentes brilhantemente marcados da descrição são, em algumas modalidades, projetados para ter brilho de emissão aumentado e vida útil de emissão consistente. Em algumas modalidades, dois marcadores de um reagente podem interagir um com o outro e/ou com um ambiente circundante, de modo que uma ou mais características de emissão sejam inconsistentes entre os dois marcadores. Características de emissão inconsistentes podem ser problemáticas, em algumas modalidades, em que os métodos de detecção de molécula única dependem dessas características para identificar um certo tipo de molécula. Por exemplo, em algumas modalidades, a vida útil inconsistente das emissões pode resultar em leituras de vida

útil que relatam dois grupos de informação separados em oposição a um único agrupamento de informação que seria observado com a vida útil de emissão consistente.

[0064] Em algumas modalidades, a vida útil de emissão consistente pode envolver a preservação da vida útil da emissão, por exemplo, ter vida útil da emissão aproximadamente inalterada em relação a um reagente marcado com menos marcador. Em algumas modalidades, a vida útil de emissão de marcadores em um reagente multiplamente marcado permanece inalterado em relação ao mesmo marcador em um reagente marcado de forma única. Como descrito aqui, aumentar o número de marcadores luminescentes em um único construto para aumentar o brilho pode, em algumas modalidades, resultar em vida útil de emissão diminuída. Em algumas modalidades, a descrição fornece composições projetadas usando restrições estruturais específicas para separar marcadores adjacentes por uma certa distância mínima que aumenta o brilho sem afetar a vida útil da emissão. Em algumas modalidades, a vida útil de emissão de um construto multiplamente marcado é comparada com a vida útil de emissão de um construto que tem menos marcador luminescente (por exemplo, ao menos um menos do mesmo tipo de corante fluoróforo). Em algumas modalidades, a vida útil de emissão é alterada em aproximadamente 30% ou menos (por exemplo, aumentada ou diminuída em menos de 30%, menos de 25%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1% ou aproximadamente 0%).

[0065] Em alguns aspectos, a descrição se refere ao reconhecimento e apreciação de que as composições detectáveis em uma reação de sequenciamento podem ser desenvolvidas para eliminar a necessidade de certos componentes do instrumento, movendo assim a tecnologia em direção a sistemas mais compactos. Por exemplo, os

instrumentos de sequenciamento geralmente exigem filtros ópticos para filtrar a luz de excitação, causando assim eventos indesejáveis de detecção no sensor. Os filtros ópticos usados para transmitir a luminescência desejada e bloquear suficientemente a luz de excitação podem ser espessos, volumosos, dispendiosos e intolerantes a variações no ângulo de incidência da luz, impedindo a miniaturização. Os inventores, no entanto, reconheceram e apreciaram que o uso de reagentes brilhantemente marcados com vida útil preservada pode reduzir a necessidade dessa filtragem ou, em alguns casos, remover completamente a necessidade de tais filtros. Os reagentes brilhantes aqui descritos permitem que seja usada menos energia óptica (por exemplo, energia de excitação), o que reduz o espalhamento e a necessidade de filtragem como um resultado.

[0066] Os aspectos do pedido fornecem reagentes brilhantemente marcados configurados de acordo com o diagrama não limitante mostrado na Figura 1A, que representa dois marcadores luminescentes conectados a um reagente 180 através de um ligante 100. Como mostrado, cada marcador luminescente é acoplado ao ligante 100 através de um espaçador. O espaçador, em algumas modalidades, forma uma ponte covalente entre marcador e ligante. Como tal, em algumas modalidades, o espaçador nem é parte da molécula luminescente nem é a parte espaçadora da composição de ligante (por exemplo, o espaçador não contém uma unidade monomérica de um ligante polimérico ou oligomérico). Uma primeira extremidade do espaçador se liga a um sítio de ligação do ligante 102, e uma segunda extremidade do espaçador se liga a um sítio de ligação do marcador 122. Em algumas modalidades, o sítio de ligação do ligante 102 pode ser aproximado pela localização da ligação covalente que une um átomo do espaçador a um átomo do ligante 100. Em algumas modalidades, o sítio de ligação do ligante 102 ocorre em um átomo

que está dentro de uma cadeia contígua do ligante 100. Em algumas modalidades, o sítio de ligação do marcador 122 pode ser aproximado pela localização da ligação covalente que une um átomo do espaçador a um átomo do marcador. Em algumas modalidades, o sítio de ligação do marcador 122 ocorre no átomo do marcador que está covalentemente ligado ao átomo do espaçador. Em algumas modalidades, o sítio de ligação do marcador 122 ocorre no átomo do espaçador que é covalentemente ligado ao átomo do marcador.

[0067] Como descrito em outra parte deste documento, em algumas modalidades, os construtos de ligantes do pedido compreendem dois ou mais marcadores luminescentes, onde marcadores luminescentes adjacentes são descritos como tendo sítios de ligação separados por uma distância mínima d_A . Em algumas modalidades, cada marcador luminescente é separado do seguinte por uma distância mínima d_L . Como mostrado na Figura 1A, em algumas modalidades, d_L é a distância entre os sítios de ligação do marcador. Em algumas modalidades, a separação marcador - marcador pode ser ainda ditada pelo tamanho de cada molécula de marcador. Por conseguinte, em algumas modalidades, os marcadores luminescentes podem ser descritos por um volume estérico aproximado ou calculado 112 de um elipsoide ou um esferoide para obter uma medição para o raio estérico, r_1 . Em algumas modalidades, os marcadores luminescentes podem ser descritos por uma circunferência estérica aproximada ou calculada de uma elipse ou um círculo para obter uma medida para o raio estérico, r_1 . Em algumas modalidades, o raio estérico (por exemplo, r_1 , r_2) pode ser calculado ou aproximado como metade da dimensão mais longa de um marcador luminescente. Por exemplo, em algumas modalidades, a estrutura química de um marcador luminescente é avaliada como uma estrutura bidimensional ou tridimensional (por exemplo, com base em uma conformação

molecular termodinamicamente favorável) usando software ou um método adequado conhecido na técnica, e um raio estérico (por exemplo, r_1 , r_2) é determinado calculando metade da dimensão mais longa da estrutura no espaço bidimensional ou tridimensional. Em algumas modalidades, os marcadores são separados pela distância mínima d_L , desde que os raios agregados do marcador ($r_1 + r_2$) sejam tais que os marcadores não se sobrepõem.

[0068] Em algumas modalidades, como ilustrado na Figura 1B, a configuração do ligante e/ou a rigidez do espaçador é tal que a distância entre os sítios de ligação d_A pode ser aproximadamente a mesma que d_L (por exemplo, como no construto 150). Em algumas modalidades, a configuração do ligante e/ou a rigidez do espaçador é tal que a distância entre os sítios de ligação d_A pode ser menor que a distância mínima d_L (por exemplo, como no construto 152). Em algumas modalidades, a configuração do ligante e/ou a rigidez do espaçador é tal que a distância entre os sítios de ligação d_A pode ser maior do que a distância mínima d_L (por exemplo, como no construto 154).

[0069] Dever-se-ia apreciar que, em algumas modalidades, os conceitos aqui descritos podem ser implementados usando qualquer estrutura molecular adequada como um ligante 100. Em algumas modalidades, o ligante é um composto orgânico. Exemplos de compostos orgânicos adequados para uso como um ligante 100 incluem, sem limitação, polifenilas, polialquinas, miméticos alfa hélice, e peptidomiméticos.

[0070] Em algumas modalidades, o ligante 100 é um oligômero, por exemplo, um ligante oligomérico composto por unidades monoméricas. Um oligômero, em algumas modalidades, compreende um ou mais tipos de unidades monoméricas. Os tipos de unidades monoméricas podem incluir, a título de exemplo e não como limitação,

nucleotídeos (por exemplo, ribonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos e seus análogos e derivados), aminoácidos (por exemplo, aminoácidos naturais e não naturais), monossacarídeos e compostos orgânicos tal como compostos contendo fenila e alquinila. Em algumas modalidades, um oligômero compreende um ou mais do mesmo tipo de unidade monomérica. Em algumas modalidades, os oligômeros compreendidos de um tipo de unidade monomérica podem ser chamados de um polímero (por exemplo, um ligante polimérico). Em algumas modalidades, um oligômero compreende dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (por exemplo, uma mistura de unidades monoméricas).

[0071] Em algumas modalidades, um oligômero (por exemplo, ligante oligomérico ou ligante polimérico) contém ao menos 5 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, um oligômero contém ao menos 10 unidades monoméricas. Em algumas modalidades, um oligômero contém ao menos 10 e menos de 200 unidades monoméricas (por exemplo, ao menos 10 e menos de 150 unidades monoméricas, ao menos 10 e menos de 100 unidades monoméricas, ao menos 10 e menos de 50 unidades monoméricas, em ao menos 10 e menos de 40 unidades monoméricas, ao menos 10 e menos de 30 unidades monoméricas ou ao menos 10 e menos de 20 unidades monoméricas).

[0072] Em algumas modalidades, o ligante (por exemplo, ligante polimérico, ligante oligomérico) é um polissacarídeo. Exemplos de polissacarídeos adequados para uso como um ligante 100 são conhecidos na técnica (por exemplo, como descrito em Solid Support Oligosaccharide and Combinatorial Carbohydrate Libraries, Wiley 2001).

[0073] Em algumas modalidades, o ligante (por exemplo, ligante polimérico, ligante oligomérico) é um peptídeo. Exemplos não limitantes de peptídeos adequados para uso como ligante 100 incluem, sem

limitação, oligopeptídeos, peptídeos cíclicos e pequenas proteínas (por exemplo, proteínas miniatura à base de peptídeos pancreáticos aviários, como as descritas por Hodges, A.M. e Schepartz, A. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129: 11024 a 11025). Os métodos de engenharia de restrições geométricas na estrutura peptídica são bem conhecidos na técnica e são considerados particularmente úteis, por exemplo, para conferir rigidez e promover a separação de marcadores. Por exemplo, o teor de prolina de uma sequência de aminoácidos peptídicos pode ser modificado para controlar a forma do peptídeo (ver, por exemplo, Kritzer, J.A., e outros (2006) ChemBioChem 7: 29 a 31). Exemplos não limitantes adicionais de técnicas úteis de engenharia de peptídeos incluem ciclização de peptídeos (ver, por exemplo, Maltsev, O.V., e outros (2016) Angewandte Chemie 55 (4): 1535 a 1539), restrição de peptídeo α -helicoidal via ligação cruzada e/ou substitutos da ligação H (ver, por exemplo, Douse, CH, e outros (2014) ACS Chem. Biol. 9: 2204 a 2209), restrição de peptídeos através de imitações cíclicas de β -folha e β -alça (ver, por exemplo, Gibbs, AC, e outros (1998) Nat. Struc. Biol. 5: 284 a 288).

[0074] Em algumas modalidades, o ligante (por exemplo, ligante polimérico, ligante oligomérico) é um ácido nucleico. Em alguns aspectos, um reagente brilhantemente marcado pode ser projetado de acordo com o diagrama mostrado na Figura 2A, que descreve genericamente dois marcadores luminescentes ligados a um construto de ácido nucleico principal. Como mostrado, em algumas modalidades, ao menos um marcador luminescente 210 é ligado a um ligante de ácido nucleico 200 em um sítio de ligação 202 através de um espaçador 220. Em algumas modalidades, o ligante de ácido nucleico 200 compreende ao menos duas fitas de oligonucleotídeo hibridizadas. Em algumas modalidades, o ligante de ácido nucleico 200 compreende ao menos dois marcadores luminescentes, em que cada marca-

dor luminescente é separado do próximo por uma distância mínima d_L . Em algumas modalidades, ao menos dois dos marcadores luminescentes são ligados à mesma fita de oligonucleotídeo, onde cada sítio de ligação é separado do próximo por uma distância mínima d_A . Em algumas modalidades, os marcadores luminescentes são ligados à fita de oligonucleotídeo por espaçadores, em que cada espaçador separa um determinado marcador luminescente do seu sítio de ligação por uma distância mínima d_{AL} .

[0075] Em algumas modalidades, as distâncias mínimas d_L , d_A e d_{AL} podem ser obtidas, por exemplo, usando métodos teóricos conhecidos na técnica (por exemplo, computacionalmente ou não). Em algumas modalidades, os métodos teóricos podem incluir qualquer abordagem que explique a estrutura molecular, tal como comprimentos de ligação, ângulos e rotação de ligação, eletrostática, helicidade de ácido nucleico, e outros fatores físicos que podem ser representativos de uma molécula em solução. Em algumas modalidades, as medições de distância podem ser obtidas experimentalmente, por exemplo, por meios cristalográficos ou espectroscópicos.

[0076] Aspectos da descrição referem-se, ao menos em parte, à descoberta de que reagentes brilhantemente marcados (por exemplo, nucleotídeos marcados) tendo um ligante de ácido nucleico podem ser projetados de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1: } 2(d_{AL}) - d_A < 12 \text{ \AA},$$

onde $2(d_{AL}) - d_A$ pode ser negativo. Em algumas modalidades, d_A é maior do que 17 angstroms (Å). Em algumas modalidades, d_A é ao menos 17 Å, mas não superior a 350 Å (por exemplo, d_A está entre cerca de 17 e 350 Å, entre cerca de 17 e 300 Å, entre cerca de 17 e 300 Å, entre cerca de 17 e 250 Å, entre cerca de 17 e 200 Å, entre cerca de 17 e 150 Å, entre cerca de 17 e 100 Å ou entre cerca de 17 e 50 Å).

[0077] Em ainda outros aspectos, os nucleotídeos marcados da descrição podem ser projetados de acordo com a Equação 2:

$$\text{Equação 2: } 2(d_{AL})/d_A < 1.$$

[0078] Em algumas modalidades, $2(d_{AL})/d_A$ é menor que 1, preferencialmente menor que 0,5. Em algumas modalidades $2(d_{AL})/d_A$ é menor que 0,1.

[0079] Em algumas modalidades, os nucleotídeos marcados da descrição podem ser projetados de acordo com a Equação 3:

$$\text{Equação 3: } [2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A < 1,$$

em que LLD é uma distância que representa a maior dimensão do marcador (LLD). Em algumas modalidades, $[2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A$ é menor que 0,5. Em algumas modalidades, $[2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A$ é menor que 0,2. Em algumas modalidades, $[2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A$ é menor que 0,1.

[0080] Em algumas modalidades, a distância mínima d_{AL} é medida a partir de um átomo aproximadamente central de um marcador luminescente 210 até um átomo na fita de oligonucleotídeo ao qual o espaçador 220 está ligado. Em algumas modalidades, a distância mínima d_{AL} é medida a partir do centro do marcador luminescente 210 (por exemplo, aproximado com base no centro de massa da molécula luminescente, ou algum outro método conhecido na técnica ou descrito em outra parte aqui) a um átomo na fita de oligonucleotídeo ao qual o espaçador 220 está ligado. Em algumas modalidades, a distância mínima d_{AL} é medida como o comprimento do espaçador 220 (por exemplo, medida a partir de um átomo do espaçador 220 que se liga ao marcador luminescente 210 a um átomo do espaçador 220 que se liga ao ácido nucleico 200). Em algumas modalidades, a distância mínima d_A é medida como a distância entre os átomos na estrutura oligonucleotídica aos quais os espaçadores estão ligados covalentemente (por exemplo, entre átomos de carbono de sítios de ligação

abásicos). Em algumas modalidades, a distância mínima d_A é medida como a distância entre as bases marcadas na fita de oligonucleotídeo (por exemplo, entre átomos nas nucleobases dos sítios de ligação básicos).

[0081] Em algumas modalidades, a distância mínima d_L é medida como a distância entre átomos aproximadamente centrais dos marcadores luminescentes adjacentes. Em algumas modalidades, os marcadores luminescentes adjacentes são separados por uma distância d_L de aproximadamente 6 angstroms. Em algumas modalidades, a distância d_L é de ao menos 6 angstroms (por exemplo, ao menos 6, ao menos 7, ao menos 8, ao menos 9, ao menos 10, ao menos 11 ou ao menos 12 angstroms). Em algumas modalidades, a distância mínima d_L é medida como uma aproximação, que pode ou não levar em consideração a configuração do espaçador, a flexibilidade do espaçador, ou a flexibilidade do ácido nucleico.

[0082] Dentre outros aspectos, a descrição fornece estratégias gerais para o desenvolvimento da distância d_L entre marcadores luminescentes, de modo que os reagentes multiplamente marcados possam ser projetados para ter brilho máximo, sem comprometer a vida útil das emissões. Em algumas modalidades, os marcadores luminescentes adjacentes de proximidade suficiente podem interagir de modo que ocorra um efeito de complexação, resultando em valores diminuídos e/ou inconsistentes para a vida útil da emissão. Por conseguinte, as estratégias gerais de projeto aqui fornecidas podem, em algumas modalidades, envolver restrições estruturais que limitam a extensão das interações entre os marcadores luminescentes adjacentes.

[0083] Em algumas modalidades, um marcador luminescente pode interagir com nucleobases de guanina de um ligante de ácido nucleico por meio de decaimento radiativo e/ou não radiativo para afetar a vida

útil de emissão diminuída e/ou inconsistente. Em algumas modalidades, os sítios de ligação de marcador luminescente são desenvolvidos minimizando o conteúdo de G/C nas regiões circundantes aos sítios de ligação. Como tal, em algumas modalidades, os sítios de ligação estão localizados em regiões ricas em A/T de uma fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, cada sítio de ligação está ao menos 2 nucleotídeos separado de um nucleotídeo G ou C na fita de oligonucleotídeo (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais de 10 nucleotídeos separado de um nucleotídeo G ou C). Assim, em algumas modalidades, cada sítio de ligação é flanqueado por ao menos 2 nucleotídeos consecutivos selecionados a partir de A ou T.

[0084] Em certas modalidades, a distância entre os sítios de ligação de uma fita de oligonucleotídeo pode ser descrita pelo número de bases não marcadas intervenientes (por exemplo, nucleotídeos intervenientes). Em algumas modalidades, os sítios de ligação em uma fita de oligonucleotídeo são separados por ao menos 5 bases não marcadas (por exemplo, ao menos 5, ao menos 6, ao menos 6, ao menos 7, ao menos 8, ao menos 9 ou ao menos 10 bases não marcadas). Em algumas modalidades, os sítios de ligação são separados por 6, 7, 8 ou 9 bases não marcadas. Em algumas modalidades, os sítios de ligação são separados por entre 5 e 100 bases não marcadas (por exemplo, entre 5 e 80, entre 5 e 60, entre 5 e 40, entre 5 e 20, ou entre 5 e 10 bases não marcadas) na fita de oligonucleotídeo.

[0085] Em algumas modalidades, os princípios de projeto aqui descritos permitem a adição de marcadores luminescentes sucessivos a um componente de reação marcado para aumentar o brilho e/ou a intensidade de luminescência. Em algumas modalidades, as técnicas do presente pedido fornecem componentes de reação multiplamente marcados tendo brilho e/ou intensidade de luminescência de acordo

com a fórmula $L_n(x)$, em que L_n é igual ao número total de marcadores luminescentes em um reagente marcado e x é igual ao brilho medido ou intensidade de fluorescência do reagente individualmente marcado correspondente. Por conseguinte, em algumas modalidades, um componente de reação marcado com dois corantes possui brilho e/ou intensidade de luminescência que é duplicada em comparação com o análogo marcado com um corante. Em algumas modalidades, um componente de reação marcado com três ou quatro corantes possui brilho e/ou intensidade de luminescência que é triplicada ou quadruplicada, respectivamente, em comparação com o análogo marcado com um corante. Em algumas modalidades, os reagentes brilhantemente marcados descritos aqui exibem brilho e/ou intensidade de luminescência que é de ao menos 70%, ao menos 80%, ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98% ou ao menos 99% do valor predito por $L_n(x)$.

[0086] Em algumas modalidades, os ligantes de ácido nucleico aqui fornecidos compreendem uma fita de oligonucleotídeo tendo ao menos dois marcadores luminescentes. A Figura 2B representa genericamente um ligante de ácido nucleico de fita simples 250 ligado a dois marcadores luminescentes. Como mostrado, um ligante de fita simples pode possuir um grau relativamente alto de flexibilidade que pode promover a interação entre os marcadores. Em algumas modalidades, os reagentes brilhantemente marcados com vida útil consistente e/ou preservada podem ser gerados usando construtos de ligante de fita simples, por exemplo, utilizando determinados marcadores que não interagem para produzir um efeito de complexação, tal como corantes à base de cianina. No entanto, para várias classes de corantes, a promoção da proximidade marcador - marcador devido à flexibilidade do ligante pode produzir vida útil de emissão diminuída e/ou inconsistente. Por conseguinte, em algumas modalidades, a fita

de oligonucleotídeo marcada é hibridizada com uma ou mais fitas de oligonucleotídeo para diminuir a flexibilidade geral do ligante de ácido nucleico.

[0087] Em algumas modalidades, a hibridização de fitas foi usada como uma estratégia geral de projeto para desenvolver uma distância d_L apropriada entre os marcadores luminescentes em um ligante de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a hibridização de fitas foi usada para aumentar a rigidez em regiões específicas de ácidos nucleicos (por exemplo, dentro de uma região marcada e/ou em uma região que separa uma região marcada de um reagente). A Figura 2B representa genericamente um ligante de ácido nucleico de fita dupla 252 que inclui uma fita de oligonucleotídeo hibridizada para enrijecer a região marcada e, assim, diminuir a flexibilidade da fita que, de outra forma, poderia promover a interação marcador - marcador.

[0088] Como ilustrado pelo ligante de ácido nucleico 252, em algumas modalidades, o movimento do marcador luminescente em torno de um ponto de ligação pode promover a proximidade marcador - marcador. Também como mostrado, em algumas modalidades, o movimento do marcador em torno de um sítio de ligação pode resultar em um marcador estando mais próximo de uma fita de oligonucleotídeo do ligante de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma fita de oligonucleotídeo pode interagir com um marcador luminescente para produzir medições da vida útil da emissão inconsistentes e/ou diminuídas. Por conseguinte, em algumas modalidades, os ligantes de ácido nucleico aqui descritos compreendem espaçadores tendo certos comprimentos, rigidezes, sítios de ligação, e/ou configurações que limitam a extensão das interações marcador - marcador e/ou marcador - ligante.

[0089] Em algumas modalidades, a distância de separação entre os marcadores luminescentes pode ser definida no contexto do volume

de espaço no qual os marcadores estão presentes um em relação ao outro. Por exemplo, a Figura 2B representa um diagrama 254 que ilustra um exemplo de como a distância d_L pode ser medida. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente pode ser definido por um volume estérico 212. Em algumas modalidades, o volume estérico 212 é aproximado como uma esfera de raio 212-r ou como uma forma elipsoide. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente compreende um volume estérico 212 tendo um ponto central que está ao menos 5 angstroms separados de qualquer outro marcador (por exemplo, os pontos centrais dos marcadores adjacentes são separados por ao menos 5 angstroms). Um ponto central de um marcador luminescente pode ser qualquer centro adequado do marcador, incluindo, por exemplo, um centro de massa ou um centro geométrico do marcador. Em algumas modalidades, um ponto central de um marcador luminescente pode ser determinado calculando-se ou aproximando-se o raio 212-r, como ilustrado na Figura 2B. Em algumas modalidades, um ponto central de um marcador luminescente pode ser calculado ou aproximado como metade da dimensão mais longa de um marcador luminescente (por exemplo, conforme descrito em outra parte aqui para r_1 e r_2 da Figura 1A).

[0090] Em algumas modalidades, a distância entre os marcadores luminescentes adjacentes (d_L) pode ser medida como a distância entre os centros de massa dos marcadores luminescentes adjacentes. O centro de massa, em algumas modalidades, refere-se à posição média de todos os átomos em um marcador luminescente, ponderado de acordo com suas massas. Os métodos para calcular o centro de massa são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Leach, A.R. *Molecular Modeling: Principles and Applications* (2ª edição), Prentice-Hall 2001; Guenza, M. (2002) *Macromolecules* 35 (7): 2714 a 2722).

[0091] Em algumas modalidades, a distância entre os marcadores

luminescentes adjacentes (d_L) pode ser medida como a distância entre os centros geométricos dos marcadores luminescentes adjacentes. Um centro geométrico de uma molécula, em algumas modalidades, refere-se à posição média de todos os átomos da molécula (por exemplo, todos os átomos em um marcador luminescente), em que os átomos não são ponderados. Assim, em algumas modalidades, o centro geométrico de uma molécula refere-se a um ponto no espaço que é uma média das coordenadas de todos os átomos na molécula.

[0092] Em algumas modalidades, o volume estérico 212 é calculado com mais precisão usando qualquer método adequado conhecido na técnica. Por exemplo, os fatores de refratividade molar em propriedades que incluem capacidade de polarização podem ser calculados de acordo com a equação:

$$\text{Refratividade molar} = [(n^2 - 1)/(n^2 + 2)] \times (\text{MW}/d),$$

onde n = índice de refração; MW = peso molecular; e d = densidade.

[0093] Em algumas modalidades, o volume estérico 212 de um marcador pode ser calculado computacionalmente para incluir fatores adicionais e/ou mais complexos. Por exemplo, o fator estérico de Verloop fornece dimensões espaciais de uma molécula com base em ângulos de ligação, raios de van der Waals, comprimentos de ligação, e possíveis conformações (por exemplo, ver Harper, K.C., e outros (2012) *Nature Chemistry* 4, 366 a 374).

[0094] Em algumas modalidades, o movimento do marcador luminescente em torno de um sítio de ligação pode ser fatorado na distância de separação d_L . Como mostrado na Figura 2B, a faixa de movimento do marcador em torno de cada sítio de ligação pode ser definida, em algumas modalidades, com base no comprimento do espaçador e no volume estérico do marcador. Essa faixa de movimento teórica é ilustrada por linhas tracejadas. Dever-se-ia considerar

que, em algumas modalidades, uma variedade das composições e estratégias de projeto descritas neste documento pode vantajosamente limitar a extensão em que a faixa de movimento se aproxima da região sobreposta mostrada. Por exemplo, em algumas modalidades, a rigidez do espaçador, o comprimento do espaçador, e a separação do sítio de ligação podem ser tratados de acordo com a descrição para limitar a extensão em que o marcador provavelmente se aproximará da região sobreposta. Também dever-se-ia apreciar que o diagrama 254 é destinado a fins ilustrativos, por exemplo, como não é necessariamente exigido que os marcadores entrem em contato físico para que ocorra decaimento radiativo e/ou não radiativo.

[0095] Em algumas modalidades, a faixa de movimento dos marcadores representada no diagrama 254 pode ser geralmente chamada de um volume espacial, por exemplo, uma área do espaço tendo regiões de probabilidade variável de que o marcador possa estar presente em um ponto no espaço a um determinado momento. Em algumas modalidades, cada marcador ocupa um volume espacial que não é substancialmente sobreposto com o de qualquer outro marcador luminescente. Em algumas modalidades, cada marcador ocupa um volume espacial que está substancialmente livre de qualquer outro marcador.

[0096] Em algumas modalidades, os sítios de ligação relativos para os marcadores luminescentes podem ser projetados tendo em vista a estrutura helicoidal de um ligante de fita dupla. A Figura 2C representa um exemplo de um ácido nucleico 260 tendo dois marcadores separados por uma distância, x . O ácido nucleico 262 (desenhado aproximadamente em escala) é ligado a dois marcadores luminescentes em sítios de ligação separados por aproximadamente metade do número de bases do ácido nucleico 260, mas a localização relativa do sítio de ligação ao longo da hélice resulta em uma distância

de separação de marcadores através do espaço de aproximadamente 2x. Como mostrado, em algumas modalidades, o ligante de ácido nucleico pode limitar ainda mais a extensão do decaimento radiativo e/ou não radiativo entre os marcadores, agindo como uma barreira estérica entre os marcadores.

[0097] Em algumas modalidades, o termo "barreira estérica" refere-se a um ligante ou uma porção de um ligante (por exemplo, um ligante de ácido nucleico ou uma porção dele) posicionado entre um marcador luminescente acoplado ao ligante e alguma outra ligação do ligante. Sem desejar estar limitado pela teoria, pensa-se que uma barreira estérica pode absorver, desviar ou, de outra forma, bloquear o decaimento radiativo e/ou não radiativo emitido pelo marcador luminescente. Em algumas modalidades, a barreira estérica impede ou limita a extensão em que um ou mais marcadores luminescentes interagem com um ou mais outros marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, a barreira estérica impede ou limita a extensão em que um ou mais marcadores luminescentes interagem com um ou mais reagentes. Em algumas modalidades, a barreira estérica impede ou limita a extensão em que um ou mais marcadores luminescentes interagem com uma ou mais moléculas associadas a um reagente (por exemplo, uma polimerase ligada ao reagente). Por conseguinte, em algumas modalidades, o termo barreira estérica pode geralmente se referir a um efeito de proteção que é fornecido por alguma porção de um ligante de ácido nucleico.

[0098] Em algumas modalidades, um ou mais motivos estruturais podem funcionar como uma barreira estérica. Por exemplo, em algumas modalidades, uma hélice formada por um ligante de ácido nucleico de fita dupla funciona como uma barreira estérica. Em algumas modalidades, uma haste - alça ou uma porção da mesma (por exemplo, uma haste, uma alça) funciona como uma barreira

estérica. Em algumas modalidades, uma junção de três vias (por exemplo, como em um ácido nucleico tendo duas ou mais hastes - alças) funciona como uma barreira estérica. Em algumas modalidades, uma fita hibridizada sem acoplamentos (por exemplo, uma fita de suporte) funciona como uma barreira estérica. Em algumas modalidades, um espaçador funciona como uma barreira estérica.

[0099] Em algumas modalidades, os reagentes brilhantemente marcados descritos aqui fornecem separação entre os marcadores luminescentes e um reagente. Em algumas modalidades, um ácido nucleico 264 compreende um reagente nucleosídeo polifosfato 280 que serve como um substrato para uma polimerase 290 em uma reação de síntese. Em algumas modalidades, os marcadores próximos ao sítio ativo da polimerase podem induzir o dano pela luz da polimerase (por exemplo, através de decaimento não radiativo ou de outra forma), o que pode ser prejudicial à atividade da polimerase. Como mostrado, o ácido nucleico 266 é ligado a um reagente de modo que ao menos uma porção do ligante esteja em uma região intermediária entre o marcador e o reagente. Como tal, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico pode funcionar como uma barreira estérica para proteger ainda mais a polimerase de dano pela luz induzido por marcador. Este efeito da proteção da polimerase pode, em algumas modalidades, ocorrer através da separação espacial marcador - reagente e/ou da presença de uma barreira estérica entre o marcador e o reagente. A proteção da polimerase é descrita em mais detalhes no pedido de patente copendente US. 15/600.979), cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[00100] Em algumas modalidades, o tamanho e a configuração dos ligantes de ácido nucleico (por exemplo, uma ou mais fitas de oligonucleotídeo e/ou um ou mais espaçadores de um ligante de ácido

nucleico) determina a distância entre um marcador luminescente e um nucleosídeo polifosfato. Em algumas modalidades, a distância é de cerca de 1 nm ou 2 nm a cerca de 20 nm. Por exemplo, mais de 2 nm, mais de 5 nm, 5 a 10 nm, mais de 10 nm, 10 a 15 nm, mais de 15 nm, 15 a 20 nm, mais de 20 nm. No entanto, a distância entre o marcador luminescente e o nucleosídeo polifosfato não pode ser muito longa, pois certas técnicas de detecção exigem que o marcador luminescente esteja dentro de um volume de iluminação definido para ser excitado (por exemplo, quando o nucleosídeo polifosfato é mantido no sítio ativo de uma polimerase). Por conseguinte, em algumas modalidades, a distância total é menor que 30 nm, menor que 25 nm, em torno de 20 nm, ou menor que 20 nm.

[00101] Em algumas modalidades, outras características das composições descritas neste documento podem ser implementadas para promover a separação marcador - reagente para minimizar o potencial de dano pela luz induzido por marcador, por exemplo, comprimento do espaçador, rigidez do espaçador, localização do sítio de ligação. Em algumas modalidades, a conectividade do reagente aos ligantes de ácido nucleico aqui descritos pode ser modificada em relação a um marcador luminescente para promover a separação marcador - reagente. A Figura 3A representa genericamente ligantes de ácido nucleico com conectividade marcador - reagente de mesma fita ou de fita oposta. Em algumas modalidades, um ácido nucleico 300 compreende dois ou mais marcadores luminescentes e um reagente ligado à mesma fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a conectividade de mesma fita resulta em uma conexão covalente entre o marcador e o reagente.

[00102] Em algumas modalidades, um ácido nucleico 302 compreende dois ou mais marcadores luminescentes e um reagente ligado a diferentes fitas de oligonucleotídeos. Em algumas modalida-

des, a conectividade de fita oposta resulta em uma conexão não covalente entre o marcador e o reagente. Em algumas modalidades, a conectividade de fita oposta do marcador e reagente ocorre através da hibridização de uma fita de oligonucleotídeo ligada ao marcador e uma fita de oligonucleotídeo ligada ao reagente. Como mostrado, em algumas modalidades, os ligantes de ácido nucleico da descrição compreendem uma distância de separação marcador - reagente d_{LR} . Em algumas modalidades, d_{LR} é a distância entre o reagente e o marcador luminescente mais próximo. Em algumas modalidades, d_{LR} é medida do sítio de ligação do marcador ao sítio de ligação do reagente. Em algumas modalidades, d_{LR} é medida a partir da molécula luminescente de um marcador até o reagente. Em algumas modalidades, d_{LR} é ao menos 1 nm. Em algumas modalidades, d_{LR} está entre cerca de 1 nm e cerca de 10 nm (por exemplo, aproximadamente 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm ou 10 nm ou mais 10 nm). Em algumas modalidades, d_{LR} está entre cerca de 2 nm e cerca de 30 nm (por exemplo, entre cerca de 2 e 25 nm, entre cerca de 2 e 20 nm, entre cerca de 2 e 15 nm, entre cerca de 2 e 15 nm, entre cerca de 2 e 10 nm, entre cerca de 2 e 5 nm, entre cerca de 5 e 10 nm, entre cerca de 10 e 20 nm, entre cerca de 5 e 30 nm, entre cerca de 15 e 30 nm, ou entre cerca de 20 e 30 nm).

[00103] A Figura 3B mostra exemplos de especificações de distância não limitantes usadas no projeto de reagentes brilhantemente marcados. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico 304 é ligado a dois marcadores luminescentes e a um nucleosídeo hexafosfato (por exemplo, um reagente) via conectividade de mesma fita. Em algumas modalidades, como mostrado, d_L é de aproximadamente 1 nm e d_{LR} é de aproximadamente 7 nm. Em algumas modalidades, os reagentes brilhantemente marcados da descrição compreendem mais de dois marcadores luminescentes. Por exemplo,

em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico 306 é ligado a três marcadores luminescentes e a um nucleosídeo hexafosfato (por exemplo, um reagente) via conectividade de mesma fita. Como mostrado, em algumas modalidades, construtos com mais de dois marcadores luminescentes acoplados a mais de dois sítios de ligação terão necessariamente mais de uma distância de separação d_L . Em algumas modalidades, cada distância de separação d_L em um único construto pode ser projetada independentemente, de acordo com a descrição deste documento. Em algumas modalidades, cada distância de separação de marcador d_L pode ser projetada para ser aproximadamente a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, cada ocorrência de distância de separação d_L é de aproximadamente 3,5 nm e d_{LR} é de aproximadamente 7 nm.

[00104] Em algumas modalidades, os reagentes brilhantemente marcados do pedido compreendem dois ou mais marcadores luminescentes ligados através de diferentes fitas de oligonucleotídeos. Por exemplo, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico 308 compreende quatro marcadores luminescentes ligados via fitas de oligonucleotídeos separadas. Em algumas modalidades, uma fita de oligonucleotídeo não marcada do ligante de ácido nucleico 308 compreende uma primeira porção que é complementar a uma primeira fita de oligonucleotídeo ligada a dois marcadores luminescentes e a um nucleosídeo polifosfato. A fita de oligonucleotídeo não marcada compreende ainda uma segunda porção que é complementar a uma segunda fita de oligonucleotídeo ligada a dois marcadores luminescentes. Como mostrado, em algumas modalidades, os sítios de ligação do marcador luminescente dentro de cada fita marcada são separados por 9 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a separação entre os sítios de ligação mais próximos em fitas marcadas não contíguas pode ser a mesma ou pode ser diferente (por exemplo,

como mostrado por uma separação de 10 nucleotídeos).

[00105] O ligante de ácido nucleico genérico não limitante 304 com conectividade marcador - reagente de mesma fita foi usado como base para gerar o nucleosídeo polifosfato marcado mostrado na Figura 3C. Como mostrado, o ligante de ácido nucleico da Figura 3C compreende duas fitas de oligonucleotídeo hibridizadas. De acordo com certas modalidades da descrição, dois marcadores luminescentes foram acoplados a sítios abásicos dentro de uma primeira fita de oligonucleotídeo do ligante. As técnicas de química de clique, como aqui descritas em outra parte como uma estratégia geral de ligação, foram usadas para conectar um nucleosídeo polifosfato à mesma fita de oligonucleotídeo. Uma segunda fita de oligonucleotídeo foi hibridizada com a primeira fita para promover conformações espaciais restritas dos componentes ligados de acordo com a teoria aqui descrita. O construto da Figura 3C foi utilizado com sucesso em uma sequência única de molécula executada com outros nucleosídeos polifosfatos marcados (Figura 3D). Um construto projetado de maneira semelhante foi gerado com conectividade de fita oposta e é mostrada na Figura 3E.

[00106] A Figura 3E representa uma estrutura exemplificativa de um ligante de ácido nucleico que conecta não covalentemente um nucleosídeo polifosfato (por exemplo, um reagente) com marcadores luminescentes. Como mostrado, uma primeira fita de oligonucleotídeo acoplada a dois marcadores luminescentes em sítios de ligação básicos foi hibridizada com uma segunda fita de oligonucleotídeo acoplada a um nucleosídeo hexafosfato em um sítio de ligação terminal. Em algumas modalidades, as estratégias de projeto fornecidas na presente descrição para gerar reagentes brilhantemente marcados são consideradas como incluindo estratégias alternativas de conjugação de marcadores, tal como marcadores integrados a um

ligante (por exemplo, integrados a um ligante oligomérico ou polimérico, tal como uma fita de oligonucleotídeo). Por exemplo, a Figura 3F representa um exemplo de um ligante de ácido nucleico tendo dois marcadores ligados dentro de uma fita de oligonucleotídeo.

[00107] Como mostrado na Figura 3F, em algumas modalidades, um reagente brilhantemente marcado compreende dois marcadores luminescentes acoplados dentro de uma fita de oligonucleotídeo (por exemplo, integrada na fita). Em algumas modalidades, essas estratégias de conjugação podem ser implementadas com moléculas luminescentes que não interagem via decaimento radiativo e/ou não radiativo, tal como corantes à base de cianina (por exemplo, como mostrado na Figura 3F, área em caixa). Em algumas modalidades, o número de moléculas luminescentes ligadas dentro de uma fita de oligonucleotídeo pode ser limitado apenas pelo tamanho da fita de oligonucleotídeo. Assim, em algumas modalidades, um reagente brilhantemente marcado compreende mais de dois marcadores luminescentes (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis marcadores luminescentes ou mais) ligados dentro de uma fita de oligonucleotídeo. O construto representado na Figura 3F foi utilizado com sucesso em uma corrida de sequenciamento com três outros nucleosídeos polifosfatos brilhantemente marcados (Figura 3G).

[00108] A descrição refere-se, em alguns aspectos, à descoberta de que ligantes de ácido nucleico podem ser projetados com conformações estruturalmente restritas que fornecem arcabouços para reagentes brilhantemente marcados com vida útil de emissão consistente e/ou preservada. Como aqui descrito, em algumas modalidades, a hibridização de fita de oligonucleotídeo é uma estratégia geral que promove conformações restritas para fins de separação de marcadores. Em algumas modalidades, a hibridização da fita de oligonucleotídeo envolve hibridização de diferentes fitas de oligonu-

cleotídeo. Em algumas modalidades, a hibridização de fita de oligonucleotídeo envolve auto-hibridização de fita (por exemplo, auto-hibridização dentro de uma única fita). Em algumas modalidades, a auto-hibridização de fita pode limitar a flexibilidade do ligante de ácido nucleico, como descrito em outro local neste documento em relação à hibridização de fita separada. Em algumas modalidades, a auto-hibridização de fita é usada para formar uma ou mais estruturas de haste - alça em um ligante de ácido nucleico.

[00109] Uma haste - alça, ou alça, é uma alça não pareada de nucleotídeos em uma fita de oligonucleotídeo que é formada quando a fita de oligonucleotídeo se dobra e forma pares de bases com outra seção da mesma fita. Em algumas modalidades, a alça não pareada de uma haste - alça compreende três a dez nucleotídeos. Por conseguinte, uma haste - alça pode ser formada por duas regiões de uma fita de oligonucleotídeo que possui sequências complementares invertidas que hibridizam para formar uma haste, onde as duas regiões são separadas pelos três a dez nucleotídeos que formam a alça não pareada. Em algumas modalidades, a haste pode ser projetada para ter um ou mais nucleotídeos G/C, que podem fornecer estabilidade adicional com a interação de ligação de hidrogênio adicional que se forma em comparação com nucleotídeos A/T. Em algumas modalidades, a haste compreende nucleotídeos G/C imediatamente adjacentes a uma sequência de alça não pareada. Em algumas modalidades, a haste compreende nucleotídeos G/C dentro dos primeiros 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos adjacentes a uma sequência de alça não pareada.

[00110] Em algumas modalidades, uma alça não pareada de um ligante de ácido nucleico de haste - alça compreende um ou mais marcadores luminescentes. Assim, em algumas modalidades, um ou mais sítios de ligação de marcador estão presentes em uma alça não pareada. Em algumas modalidades, um sítio de ligação ocorre em um

sítio abásico na alça não pareada Em algumas modalidades, um sítio de ligação ocorre na base da alça não pareada. Em algumas modalidades, uma alça compreende uma sequência rica em A/T/U, por exemplo, devido a um efeito de complexação observado com guanina, como descrito em outro local neste documento. Em algumas modalidades, o sítio de ligação ocorre em um nucleotídeo A, T ou U na alça não pareada. Em algumas modalidades, ao menos quatro nucleotídeos A, T ou U consecutivos ocorrem em ambos os lados de um sítio de ligação. Em algumas modalidades, uma alça não pareada compreende menos de 33% de conteúdo de G/C (por exemplo, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, ou 0% de conteúdo de G/C).

[00111] Em algumas modalidades, um marcador luminescente é acoplado a uma alça não pareada de uma haste - alça (por exemplo, o sítio de ligação do marcador ocorre dentro da alça). Por exemplo, a Figura 4A representa genericamente um exemplo de um reagente marcado tendo um ligante de ácido nucleico de haste - alça 400. Como mostrado, em algumas modalidades, uma primeira fita de oligonucleotídeo 410 se auto-hibridiza para formar uma haste - alça. Em algumas modalidades, a porção auto-hibridizada da fita de oligonucleotídeo forma uma haste 412 da haste - alça. Em algumas modalidades, a auto-hibridização de fita resulta na formação de um alça 414 de uma haste - alça (por exemplo, uma alça não pareada). Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo 410 é ainda hibridizada com uma segunda fita de oligonucleotídeo 420 ligada a um reagente. Assim, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça conecta de maneira não covalente um marcador luminescente a um reagente via conectividade de fita oposta. Dever-se-ia considerar que, em algumas modalidades, uma fita de oligonucleotídeo auto-hibridizada (por exemplo, uma fita com uma haste - alça) acoplada a um marcador luminescente pode ser

acoplada a um ou mais reagentes por meio de conectividade de mesma fita.

[00112] Em algumas modalidades, dois ou mais marcadores luminescentes são acoplados a um ligante de ácido nucleico de haste - alça. Por exemplo, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça 402 é acoplado a dois marcadores luminescentes. Como mostrado, em algumas modalidades, os sítios de ligação para os dois marcadores luminescentes ocorrem dentro da alça da haste - alça. Em algumas modalidades, a estabilidade fornecida pela região de haste auto-hibridizada resulta na região de alça tendo um nível relativamente baixo de flexibilidade. Em algumas modalidades, os sítios de ligação de marcador luminescente dentro de uma alça não pareada podem ser projetados para promover uma separação espacial favorável de marcador e/ou uma separação espacial favorável de marcador - reagente. O exemplo fornecido pelo ligante de ácido nucleico de haste - alça 402 não limitante representa os sítios de ligação do marcador que são separados um do outro por uma distância aproximada do diâmetro da alça. Em algumas modalidades, esse projeto pode maximizar a separação marcador - marcador através do espaço. Em algumas modalidades, esse projeto limita ainda mais a extensão da interação marcador - marcador através de um efeito de barreira estérica fornecido pela alça, como descrito em outro local neste documento. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça compreende duas ou mais hastes - alças (Figura 4B).

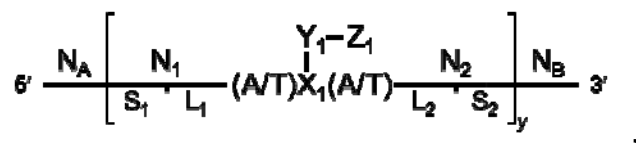
[00113] Como mostrado na Figura 4B, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça 404 compreende duas hastes - alças. Em algumas modalidades, a formação de duas hastes - alças resulta em um ligante de ácido nucleico com uma forma de Y, de modo que uma junção de três vias 410 seja formada. Em algumas

modalidades, as junções de três vias são consideradas como uma estratégia de projeto geral devido à relativa estabilidade e conformação geometricamente restrita que resulta dessas características. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça 404 compreende um marcador luminescente acoplado a cada alça. Em algumas modalidades, um ácido nucleico de haste - alça 404 conecta de maneira não covalente um marcador luminescente e um reagente através de conectividade de fita oposta, por exemplo, um ou mais marcadores acoplados a uma primeira fita de oligonucleotídeo hibridizada com uma segunda fita de oligonucleotídeo hibridizada acoplada a um ou mais reagentes. Em algumas modalidades, um ácido nucleico de haste - alça 406 conecta um marcador luminescente e um reagente por meio de conectividade na mesma fita (por exemplo, um ou mais marcadores e um ou mais reagentes ligados à mesma fita de oligonucleotídeo). O ácido nucleico de haste - alça 406 representa um exemplo de especificações de distância não limitantes usadas no projeto de reagentes brilhantemente marcados tendo uma junção de três vias. Por exemplo, essas distâncias aproximadas foram usadas como base para gerar o nucleosídeo polifosfato marcado mostrado na Figura 4C. O construto da Figura 4C foi usado com sucesso em uma corrida de sequenciamento de única molécula com outros nucleosídeos polifosfatos marcados (Figura 4D).

[00114] Em algumas modalidades, um ou mais marcadores luminescentes são acoplados a uma haste de uma haste - alça. Em algumas modalidades, uma haste - alça de um ligante de ácido nucleico não compreende um marcador luminescente. Em algumas modalidades, uma haste - alça de um ligante de ácido nucleico compreende uma região não pareada dentro da haste (por exemplo, um "alça de abaulamento"). Em algumas modalidades, um ou mais motivos estruturais não marcados, tal como hastes - alças, são

incluídos no ligante de ácido nucleico (por exemplo, em uma posição no ligante de ácido nucleico, de modo que está entre os um ou mais marcadores luminescentes e os ou mais nucleosídeos polifosfatos). Em tais modalidades, os um ou mais motivos estruturais não marcados podem fornecer um efeito de barreira estérica, como descrito em outra parte deste documento.

[00115] Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico de haste - alça compreende uma primeira fita de oligonucleotídeo acoplada a um marcador luminescente. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é acoplado a um sítio de ligação na primeira fita de oligonucleotídeo através de um espaçador. Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo forma uma estrutura secundária de haste - alça tendo uma haste e uma alça (por exemplo, uma alça não pareada). Em algumas modalidades, a alça compreende o sítio de ligação. Em algumas modalidades, o ligante de ácido nucleico compreende uma segunda fita de oligonucleotídeo hibridizada com a primeira fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a segunda fita de oligonucleotídeo está ligada a um nucleosídeo polifosfato. Em algumas modalidades, o nucleosídeo polifosfato é acoplado à segunda fita de oligonucleotídeo através de um espaçador. Em algumas modalidades, a primeira fita de oligonucleotídeo é de estrutura:



em que N_A e N_B são, cada um, uma sequência consecutiva de 5 a 40 nucleotídeos selecionados independentemente a partir de A, U, T, G e C, em que a segunda fita de oligonucleotídeo é hibridizada ou a uma porção 5' de N_A ou uma porção 3' de N_B ; os colchetes denotam uma região que forma y hastes - alças, cada haste - alça tendo uma haste e uma alça, em que y é 1 a 3; N_1 e N_2 são, cada um, uma sequência

consecutiva de 5 a 20 nucleotídeos selecionados independentemente a partir de A, U, T, G e C, em que: uma porção 5' de N_1 (S_1) e uma porção 3' de N_2 (S_2) são complementarmente inversas ou complementarmente parcialmente inversas e são capazes de hibridizar uma com a outra para formar o motivo da haste; uma porção 3' de N_1 (L_1), uma porção 5' de N_2 (L_2) e uma região intermediária formam o motivo da alça quando S_1 e S_2 hibridizam para formar o motivo da haste; (A/T) é um nucleotídeo selecionado a partir de A, T e U; X_1 é o sítio de ligação na segunda fita de oligonucleotídeo; Y_1 é o primeiro ligante; e Z_1 é o marcador luminescente.

[00116] Como descrito neste documento, aspectos da descrição referem-se a configurações de ligantes geometricamente restritas para conectar um ou mais marcadores luminescentes a um ou mais reagentes (por exemplo, um ou mais nucleosídeos polifosfatos). Em algumas modalidades, uma configuração geometricamente restrita refere-se a um ligante de ácido nucleico com dois ou mais marcadores luminescentes, onde os marcadores luminescentes são espacialmente separados por uma configuração simétrica. Em alguns aspectos, os reagentes brilhantemente marcados da descrição compreendem ligantes de ácido nucleico que se assemelham a uma configuração em forma de árvore, como representado na Figura 5A. Em algumas modalidades, o ligante em forma de árvore 500 compreende um ligante de ácido nucleico marcado com tris conectado a um reagente (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato). Como mostrado, em algumas modalidades, o ligante em forma de árvore 500 compreende três componentes principais de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um primeiro componente de oligonucleotídeo 510 compreende quatro fitas de oligonucleotídeo ligadas covalentemente por meio de um ligante ramificado. Em algumas modalidades, cada uma das três das fitas de oligonucleotídeo do componente 510 está ligada a um

marcador luminescente (por exemplo, via acoplamento terminal ou outra estratégia de conjugação aqui descrita). Por conseguinte, em algumas modalidades, as três fitas de oligonucleotídeo marcadas do componente 510 são geralmente chamadas de uma porção marcada do componente 510. Em algumas modalidades, uma quarta fita de oligonucleotídeo do componente 510 não é marcada. Em algumas modalidades, a quarta fita de oligonucleotídeo é hibridizada com um segundo componente de oligonucleotídeo 520. Em algumas modalidades, o segundo componente de oligonucleotídeo 520 do ligante de ácido nucleico 500 é ligado a um reagente (por exemplo, via acoplamento terminal ou outra estratégia de conjugação aqui descrita). Em algumas modalidades, um terceiro componente de oligonucleotídeo 530 é hibridizado com as três fitas de oligonucleotídeo da porção marcada do componente 510. Em algumas modalidades, o terceiro componente de oligonucleotídeo 530 é chamado de uma fita de suporte, pois sua hibridização com o componente 510 fornece rigidez estrutural na região marcada para promover a separação espacial dos marcadores luminescentes.

[00117] Como dever-se-ia apreciar, qualquer uma das estratégias de projeto do ligante descritas aqui pode ser aplicada a um ligante de ácido nucleico em forma de árvore ou a qualquer outra configuração de ligante de ácido nucleico considerada pela descrição (por exemplo, conectividade de fita, propriedades de espaçador e configurações de espaçador, separação marcador - marcador, separação marcador - reagente, junções de três vias, etc.). O ácido nucleico em forma de árvore 502 representa um exemplo de especificações de distância não limitantes usadas no projeto de reagentes brilhantemente marcados tendo um ligante de ácido nucleico em forma de árvore. Como um exemplo ilustrativo, essas distâncias aproximadas foram usadas como base para gerar o nucleosídeo polifosfato marcado mostrado na Figura

substituído ou não substituído, heterociclileno substituído ou não substituído, carbociclileno substituído ou não substituído, arileno substituído ou não substituído, heteroarileno substituído ou não substituído, e combinações dos mesmos; e cada ocorrência de O é um átomo de oxigênio de um grupo 5' fosfato ou um grupo 3' hidroxila de uma fita de oligonucleotídeo adjacente.

[00119] Em alguns aspectos, a descrição fornece reagentes brilhantemente marcados com ligantes de ácido nucleico em forma de estrela. Como mostrado na Figura 6A, os ligantes de ácido nucleico em forma de estrela podem fornecer reagentes dispostos simetricamente em uma região externa do ligante e um ou mais marcadores luminescentes mais próximos a uma região central da configuração. Dessa maneira, em algumas modalidades, os reagentes podem ser mais suscetíveis a reagir, por exemplo, com uma polimerase. Em algumas modalidades, o teor de nucleotídeo que circunda os sítios de ligação do marcador luminescente perto da região central é selecionado de acordo com as especificações aqui descritas (por exemplo, baixo conteúdo de G/C para evitar um efeito de complexação entre um marcador e o ligante). Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico em forma de estrela 600 compreende um componente de oligonucleotídeo em forma de Y tendo três fitas de oligonucleotídeo acopladas por meio de um ligante ramificado. Em algumas modalidades, cada uma das três fitas de oligonucleotídeo do componente de oligonucleotídeo em forma de Y é conectada (por exemplo, terminalmente) a um reagente. Em algumas modalidades, cada uma das três fitas de oligonucleotídeo do componente de oligonucleotídeo em forma de Y é hibridizada com uma fita de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, uma das fitas de oligonucleotídeo hibridizadas é acoplada a um marcador luminescente. Em algumas modalidades, no entanto, duas ou três das fitas de

oligonucleotídeo hibridizadas são, cada uma, ligada a um marcador luminescente.

[00120] Em algumas modalidades, o componente de oligonucleotídeo em forma de Y de um ligante de ácido nucleico em forma de estrela é ligado a mais de três reagentes. Por exemplo, em algumas modalidades, um reagente brilhantemente marcado tendo um ligante de ácido nucleico em forma de estrela 602 compreende dois reagentes em cada uma das duas fitas de oligonucleotídeo do componente de oligonucleotídeo em forma de Y. Em algumas modalidades, os dois reagentes são ligados a fitas do componente de oligonucleotídeo em forma de Y que são hibridizados com fitas não marcadas, como mostrado.

[00121] Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico em forma de estrela compreende um componente de oligonucleotídeo marcado e um componente de oligonucleotídeo reagente, em que cada componente de oligonucleotídeo compreende um oligonucleotídeo em forma de Y. Por exemplo, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico em forma de estrela 604 compreende um primeiro componente de oligonucleotídeo em forma de Y ligado a três marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, cada marcador luminescente é acoplada a cada fita de oligonucleotídeo do primeiro componente em forma de Y. Em algumas modalidades, como mostrado, cada marcador luminescente é acoplado perto de uma região central do primeiro componente de oligonucleotídeo em forma de Y. Em algumas modalidades, o ligante de ácido nucleico em forma de estrela 604 é hibridizado com um segundo componente de oligonucleotídeo em forma de Y ligado a três reagentes. Em algumas modalidades, cada reagente é conectado a cada fita de oligonucleotídeo do segundo componente em forma de Y. Em algumas modalidades, como mostrado, cada reagente é acoplado a uma região

externa do primeiro componente de oligonucleotídeo em forma de Y (por exemplo, através de sítios de ligação terminais). O ácido nucleico em forma de estrela 606 representa um exemplo de especificações de distância não limitante usadas no projeto de reagentes brilhantemente marcados tendo um ligante de ácido nucleico em forma de estrela. Uma estrutura exemplificativa de um reagente brilhantemente marcado com um ligante de ácido nucleico em forma de estrela gerado de acordo com a descrição é mostrada na Figura 6B.

[00122] Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico em forma de estrela pode ser descrito em termos de um composto de acoplamento covalente usado em um componente de oligonucleotídeo em forma de Y do ligante. Por exemplo, em algumas modalidades, um reagente brilhantemente marcado tendo um ligante de ácido nucleico em forma de estrela compreende um primeiro componente de oligonucleotídeo que compreende três ou mais fitas de oligonucleotídeo que se estendem a partir de um composto de acoplamento covalente. Em algumas modalidades, ao menos uma das fitas de oligonucleotídeo está ligada a um reagente (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato). Em algumas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais) das fitas de oligonucleotídeo do primeiro componente de oligonucleotídeo estão, cada uma, ligadas a um ou mais reagentes. Em algumas modalidades, o primeiro componente de oligonucleotídeo é hibridizado com um segundo componente de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, o segundo componente de oligonucleotídeo compreende ao menos uma fita de oligonucleotídeo ligada a um marcador luminescente. Em algumas modalidades, o segundo componente de oligonucleotídeo compreende três ou mais fitas de oligonucleotídeo que se estendem a partir de um composto de acoplamento covalente. Em algumas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais) das fitas de oligonucleotídeo do segundo

componente de oligonucleotídeo estão, cada uma, ligadas a um marcador luminescente.

[00123] Em alguns aspectos, os reagentes brilhantemente marcados da descrição compreendem um ligante de ácido nucleico tendo um núcleo tetraédrico. Como ilustrado pela estrutura exemplificativa da Figura 6C, um núcleo tetraédrico refere-se a um composto de acoplamento covalente de quatro vias que promove um arranjo espacial simetricamente restrito de um ou mais marcadores luminescentes e um ou mais nucleosídeos polifosfatos. A Figura 6D representa um exemplo de um esquema de reação que pode ser usado para sintetizar a estrutura exemplificativa mostrada na Figura 6C. Em algumas modalidades, um núcleo tetraédrico é considerado para uso em combinação com qualquer uma de uma ou mais das estratégias de projeto de reagentes brilhantemente marcados descritos aqui. Como um exemplo, os benefícios simetricamente restritos fornecidos por um núcleo tetraédrico foram implementados com junções de três vias aqui descritas para gerar o reagente brilhantemente marcado mostrado na Figura 6E. Como mostrado, em algumas modalidades, a ligação de um marcador luminescente a uma junção de três vias ou próximo dela pode fornecer vantajosamente um efeito estérico, como descrito em outras partes deste documento.

[00124] Em algumas modalidades, a descrição considera outras configurações simetricamente restritas usando acopladores químicos de núcleo que permitem o acoplamento simétrico. Em algumas modalidades, por exemplo, um reagente brilhantemente marcado compreende um núcleo à base de ciclodextrina. Um esquema sintético exemplificativo para gerar um ligante de ácido nucleico à base de ciclodextrina com junções de três vias é mostrado na Figura 7. Uma estrutura exemplificativa de um composto de acoplamento de ciclodextrina é fornecida na Tabela 1, juntamente com exemplos de

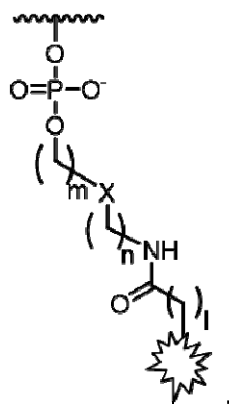
[00125] Como descrito neste documento, em algumas modalidades, marcadores luminescentes e/ou reagentes podem ser ligados a um ligante de ácido nucleico através de um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador se liga a uma fita de oligonucleotídeo do ligante de ácido nucleico em um sítio de ligação. Em algumas modalidades, o sítio de ligação ocorre em um sítio terminal na fita de oligonucleotídeo (por exemplo, na extremidade 5' ou 3'). Exemplos de sítios de ligação terminais são fornecidos no presente pedido, por exemplo, como mostrado nas Figuras 3C, 3E, 4C, 6B, 6C, 8, 9 e 10 (acoplamento terminal de nucleotídeos) e nas Figuras 5B, 9 e 10 (acoplamento terminal de marcadores luminescentes). Em algumas modalidades, o sítio de ligação ocorre em um sítio abásico dentro da fita de oligonucleotídeo (por exemplo, em um sítio que carece, mas é adjacente aos nucleotídeos). Exemplos de sítios de ligação abásicos são fornecidos no presente pedido, por exemplo, como mostrado nas Figuras 3C, 3E, 6B, 6C e 8 (acoplamento abásico de marcadores luminescentes). Em algumas modalidades, o sítio de ligação ocorre em um sítio básico na fita de oligonucleotídeo (por exemplo, ligado a um nucleotídeo, tal como a nucleobase, açúcar ou fosfato de um nucleotídeo na fita). Exemplos de sítios de ligação básicos são fornecidos no presente pedido, por exemplo, como mostrado nas Figuras 4C e 8 (acoplamento básico de marcadores luminescentes).


[00126] Em algumas modalidades, um espaçador compreende uma pluralidade de nucleotídeos de timidina. Em algumas modalidades, o espaçador compreende um espaçador ramificado, por exemplo, um espaçador de timidina ramificado. Em algumas modalidades, o espaçador ramificado compreende um espaçador de timidina ramificado. Por exemplo, em algumas modalidades, cada nucleosídeo polifosfato compreende um espaçador de timidina de fórmula $\text{Nu} - \text{T}(\text{T})_n\text{T} - \text{R}$, em que Nu representa um nucleosídeo polifosfato, T

representa um nucleotídeo de timidina, n é um número inteiro com um valor entre 1 e 30, e R representa um ponto de convergência conectando um ou mais nucleosídeos polifosfatos adicionais. Em algumas modalidades, o ponto de convergência é ainda ligado diretamente a uma fita de oligonucleotídeo do ácido nucleico. Em algumas modalidades, o ponto de convergência é adicionalmente acoplado indiretamente à fita de oligonucleotídeo, por exemplo, através de outros ligantes de timidina e/ou outros pontos de convergência. Um exemplo de um espaçador de timidina ramificado é mostrado na Figura 5B, que descreve dois nucleosídeos polifosfatos tendo espaçadores de timidina e um ponto de convergência que é adicionalmente ligado diretamente a uma fita de oligonucleotídeo.

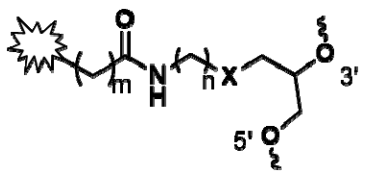
[00127] Em algumas modalidades, um espaçador contém um ou mais pontos de divergência de modo que dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) nucleosídeos polifosfatos estejam conectados a cada marcador luminescente, dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) marcadores luminescentes estejam conectados a cada nucleosídeo polifosfato, ou dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) nucleosídeos polifosfatos estejam conectados a dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) marcadores luminescentes.


[00128] Em algumas modalidades, o espaçador é acoplado a um sítio terminal em uma fita de oligonucleotídeo de um ligante de ácido nucleico. Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado na extremidade 5' ou 3' de uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador genérico mostrado abaixo:



onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente); $m > 1$; $n > 1$; e $m + n < 10$.

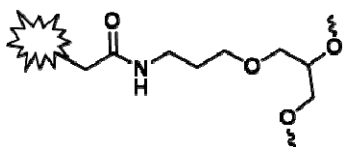
[00129] Em algumas modalidades, o espaçador é acoplado a um sítio abásico interno dentro de uma fita de oligonucleotídeo de um ligante de ácido nucleico. Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um local abásico interno em uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador genérico mostrado abaixo:




onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente); $n > 1$; e $X = \text{CH}_2$ ou O .

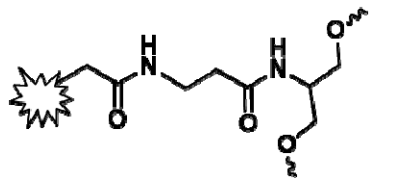
[00130] Exemplos de espaçadores para acoplamento de marcador luminescente (por exemplo, através de sítios terminais, abásicos internos ou básicos) são fornecidos na Tabela 2 e mostrados abaixo. Embora as estruturas do espaçador possam ser mostradas tendo marcadores luminescentes, dever-se-ia considerar que, em algumas modalidades, um reagente pode ser substituído de modo que qualquer uma das estruturas de espaçador aqui fornecidas possa ser usada para conectar um reagente (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) a um ligante de ácido nucleico.


[00131] Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um sítio abásico interno em uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador de glicolamina mostrado abaixo:



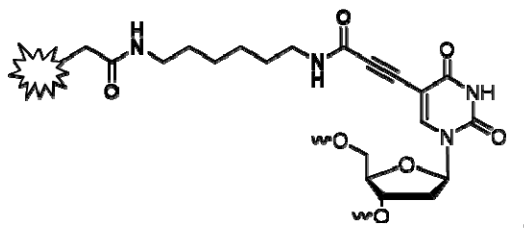
onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente).


[00132] Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um sítio abásico interno em uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador de serinolamina mostrado abaixo:



onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente).

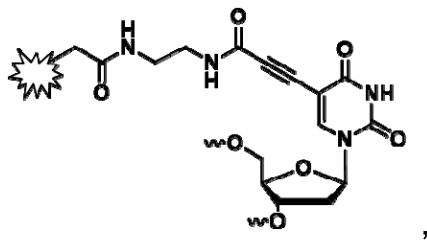
[00133] Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um sítio básico interno em uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador C6-amino-T mostrado abaixo:




onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente).

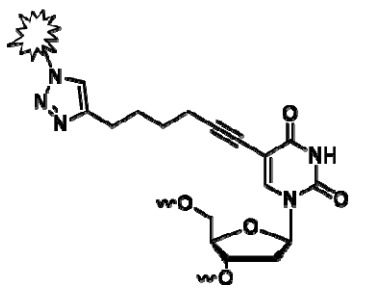
[00134] Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um sítio básico interno em uma fita de


oligonucleotídeo através do espaçador C2-amino-T mostrado abaixo:



onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente).

[00135] Em algumas modalidades, um marcador luminescente e/ou um reagente é acoplado em um sítio básico interno em uma fita de oligonucleotídeo através do espaçador C8-alkino-dT mostrado abaixo:



onde  é um marcador luminescente (ou, em uma modalidade alternativa, um reagente).

[00136] Em algumas modalidades, um ou mais marcadores luminescentes e/ou um ou mais reagentes (por exemplo, um ou mais nucleosídeos polifosfatos) podem ser ligados a um ligante de ácido nucleico usando técnicas de acoplamento químico conhecidas na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, as técnicas de química de clique (por exemplo, química de clique catalisada por cobre, promovida por tensão, isenta de cobre, etc.) podem ser usadas para acoplar um ou mais marcadores luminescentes e um ou mais nucleosídeos polifosfatos ao ácido nucleico. Em algumas modalidades, um nucleosídeo polifosfato é acoplado a um ligante de ácido nucleico por meio de um dN6P conjugado com azida (por exemplo, dN6P-N₃),

Tabela 2. Exemplos de espaçadores de clique

[00140] Como aqui utilizado, um "ligante de ácido nucleico" geralmente se refere a um ácido nucleico que conecta um ou mais marcadores luminescentes a um ou mais nucleosídeos polifosfatos. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico pode geralmente se referir a um construto com qualquer número de fitas de

oligonucleotídeos conectadas por meio de ligação covalente ou por pareamento de bases (por exemplo, hibridização). Em algumas modalidades, um ligante pode ser alternativamente chamado de um construto de "núcleo" ou de "base" ao qual diferentes componentes funcionais (por exemplo, um ou mais marcadores luminescentes, um ou mais nucleosídeos polifosfatos) podem ser conectados. O termo "construto" é, em algumas modalidades, usado em vários contextos para geralmente se referir a um ligante, e pode ou não abranger os vários outros componentes descritos aqui (por exemplo, espaçador, marcador, nucleosídeo polifosfato, etc.).

[00141] Em algumas modalidades, os ligantes de ácido nucleico aqui descritos não estão ligados a uma partícula de material (por exemplo, não estão ligados a uma partícula de material metálico, magnético, polimérico ou outro). Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico é uma molécula linear (por exemplo, um ácido nucleico "em forma de bastonete"). Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico é uma molécula circular. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico é de fita simples (por exemplo, com ou sem estruturas de haste - alça). Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico é de fita dupla (por exemplo, com ou sem estruturas de haste - alça). Em algumas modalidades, as duas fitas de um ligante de ácido nucleico de fita dupla são hibridizadas (devido a sequências complementares) e não estão ligadas covalentemente. No entanto, em algumas modalidades, uma ou mais ligações covalentes podem ser introduzidas (por exemplo, usando um ou mais ligantes químicos) para conectar covalentemente duas fitas de um ligante de fita dupla. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico pode incluir uma ou mais porções adicionais, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico inclui i) uma ou mais porções adicionais dentro ou nas extremidades da

estrutura de fosfato de açúcar, ii) uma ou mais modificações (por exemplo, uma ou mais bases ou açúcares modificados) ou uma combinação de i) e ii). No entanto, em algumas modalidades, um ligante de ácido nucleico não inclui i), ii) ou qualquer um de i) ou ii).

[00142] Dever-se-ia entender que, no contexto de um ligante de ácido nucleico, um "nucleotídeo" ou "nucleosídeo polifosfato" acoplado a ele se refere a um ou mais nucleotídeos (por exemplo, nucleosídeos polifosfatos) que estão configurados para serem incorporados a uma fita de ácido nucleico em crescimento (por exemplo, durante uma reação de sequenciamento). Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos compreendem um ou mais nucleosídeos monofosfatos ou nucleosídeos polifosfatos. Exemplos de nucleosídeos polifosfatos incluem, em algumas modalidades, nucleosídeo ou nucleosídeos di- ou trifosfatos com mais de três 5' fosfatos, tal como nucleosídeos hexafosfatos. Por conseguinte, em algumas modalidades, um "nucleotídeo marcado" refere-se a um nucleosídeo polifosfato conectado a um ou mais marcadores luminescentes através de um ligante do pedido, em que o nucleosídeo polifosfato atua como um substrato para uma enzima polimerase em condições de reação de síntese de ácido nucleico. Em algumas modalidades, o nucleosídeo polifosfato compreende ao menos um grupo difosfato ou um grupo trifosfato que pode ser acionado por uma enzima polimerase adequada em uma reação de transferência de fosforil (por exemplo, transferência do α -fosfato do nucleosídeo polifosfato a partir de seu β -fosfato ao grupo 3' hidroxila de uma fita de ácido nucleico crescente).

[00143] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleosídeos fosfatos (por exemplo, nucleosídeos polifosfatos) podem ser ligados através de um fosfato terminal a um oligonucleotídeo (por exemplo, uma fita de oligonucleotídeo marcada ou não marcada) que faz parte de um ligante do pedido, que pode funcionar como uma molécula de

proteção que protege uma polimerase contra danos por luz induzidos por marcador (por exemplo, como descrito em outras partes deste pedido). Em algumas modalidades de qualquer uma das composições ou métodos descritos neste pedido, uma porção fosfato (por exemplo, uma porção polifosfato) de um nucleosídeo fosfato (por exemplo, de um nucleosídeo polifosfato) inclui um ou mais fosfatos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 grupos fosfato ou mais) ou variantes dos mesmos. Por exemplo, em algumas modalidades, uma porção fosfato (por exemplo, uma porção polifosfato) de um nucleosídeo fosfato (por exemplo, de um nucleosídeo polifosfato) pode incluir um fosfato éster, um tioéster, um fosforamidato, uma ligação alquil fosfonato, outra ligação adequada, ou mais de uma dessas modificações, ou uma combinação de duas ou mais delas. Em algumas modalidades, as fitas marcadas e não marcadas de um ligante de ácido nucleico são substancialmente complementares entre si (por exemplo, ao longo do comprimento de um domínio de dimerização, em que as fitas no domínio de dimerização podem ter, por exemplo, ao menos 60%, ao menos 70%, ao menos 75%, ao menos 80%, ao menos 85%, ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98%, ao menos 99% ou 100% complementares entre si).

[00144] Um nucleosídeo polifosfato pode ter n grupos fosfato, em que n é um número que é maior ou igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Exemplos de nucleosídeos polifosfatos incluem nucleosídeo difosfato e nucleosídeo trifosfato. Um nucleotídeo marcado pode ser um nucleosídeo polifosfato marcado com fosfato terminal, de modo que um fosfato terminal do nucleosídeo polifosfato seja acoplado a um ligante (por exemplo, um ligante de ácido nucleico) que compreende um ou mais marcadores luminescentes, formando assim um nucleosídeo polifosfato marcado. Esse marcador pode ser um marcador luminescente (por exemplo, fluorescente ou quimioluminescente), um

marcador fluorogênico, um marcador colorido, um marcador cromogênico, um marcador de massa, um marcador eletrostático, ou um marcador eletroquímico. Um marcador pode ser acoplado a um fosfato terminal através de um ligante, tal como um espaçador, como aqui descrito. O ligante (por exemplo, espaçador) pode incluir, por exemplo, ao menos um ou uma pluralidade de grupos hidroxila, grupos sulfidríla, grupos amino ou grupos haloalquila, que podem ser adequados para formar, por exemplo, um fosfato éster, um tioéster, um fosforamidato, ou uma ligação alquil fosfonato no fosfato terminal de um nucleotídeo natural ou modificado. Um ligante (por exemplo, um espaçador) pode ser clivável de modo a separar um marcador do fosfato terminal, tal como com o auxílio de uma enzima de polimerização. Exemplos de nucleotídeos e ligantes (por exemplo, espaçadores) são fornecidos na Patente U.S. No. 7.041.812, que é inteiramente incorporada aqui por referência.

[00145] Um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) pode compreender qualquer um de uma adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) e uracila (U), ou variantes dos mesmos. Um nucleotídeo (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato) pode compreender uma nucleobase metilada. Por exemplo, um nucleotídeo metilado pode ser um nucleotídeo que compreende um ou mais grupos metila ligados à nucleobase (por exemplo, ligados diretamente a um anel da nucleobase, ligados a um substituinte de um anel da nucleobase). As nucleobases metiladas exemplificativas incluem 1-metiltimina, 1-metiluracila, 3-metiluracila, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 1-metiladenina, 2-metiladenina, 7-metiladenina, N6-metiladenina, N6, N6-dimetiladenina, 1-metilguanina, 7-metilguanina, N2-metilguanina e N2, N2-dimetilguanina.

[00146] O termo "ácido nucleico", como aqui utilizado, geralmente se refere a uma molécula compreendendo uma ou mais subunidades

de ácido nucleico. Um ácido nucleico pode incluir uma ou mais subunidades selecionadas a partir de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) e uracila (U), ou variantes dos mesmos. Em alguns exemplos, um ácido nucleico é ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA), ou seus derivados. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é um ácido nucleico modificado, incluindo, sem limitação, um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico peptídico (PNA), um ácido nucleico ligado a triazol, um ácido nucleico 2'-F-modificado, e seus derivados e análogos. Um ácido nucleico pode ser de fita simples ou de fita dupla. Em algumas modalidades, um ácido nucleico geralmente se refere a qualquer polímero de nucleotídeos.

[00147] Em algumas modalidades, a descrição fornece novas composições para identificar moléculas únicas com base em uma ou mais propriedades de luminescência dessas moléculas. Em algumas modalidades, uma molécula (por exemplo, um nucleosídeo polifosfato luminescentemente marcado) é identificada com base em seu brilho, vida útil de luminescência, espectro de absorção, espectro de emissão, rendimento quântico luminescente, intensidade de luminescência, ou uma combinação de duas ou mais. Identificar pode significar atribuir a identidade molecular exata de uma molécula, ou significar distinguir ou diferenciar a molécula particular de um conjunto de possíveis moléculas. Em algumas modalidades, uma pluralidade de moléculas únicas pode ser distinguida entre si com base em diferentes brilhos, vidas úteis de luminescência, espectro de absorção, espectro de emissão, rendimento quântico luminescente, intensidades de luminescência, ou combinações de duas ou mais das mesmas. Em algumas modalidades, uma única molécula é identificada (por exemplo, distinguida de outras moléculas) expondo a molécula a uma série de pulsos de luz separados e avaliando o tempo ou outras

propriedades de cada fóton que é emitido a partir da molécula. Em algumas modalidades, as informações para uma pluralidade de fótons emitidos sequencialmente a partir de uma única molécula são agregadas e avaliadas para identificar a molécula. Em algumas modalidades, uma vida útil de luminescência de uma molécula é determinada a partir de uma pluralidade de fótons que são emitidos sequencialmente a partir da molécula, e a vida útil de luminescência pode ser usada para identificar a molécula. Em algumas modalidades, uma intensidade de luminescência de uma molécula é determinada a partir de uma pluralidade de fótons que são emitidos sequencialmente a partir da molécula, e a intensidade de luminescência pode ser usada para identificar a molécula. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência e a intensidade de luminescência de uma molécula são determinadas a partir de uma pluralidade de fótons que são emitidos sequencialmente a partir da molécula, e a vida útil de luminescência e a intensidade de luminescência podem ser usadas para identificar a molécula.

[00148] Por conseguinte, em alguns aspectos do pedido, uma amostra de reação é exposta a uma pluralidade de pulsos de luz separados e uma série de fótons emitidos é detectada e analisada. Em algumas modalidades, a série de fótons emitidos fornece informações sobre uma única molécula que está presente e que não muda na amostra de reação ao longo do tempo do experimento. No entanto, em algumas modalidades, a série de fótons emitidos fornece informações sobre uma série de moléculas diferentes que estão presentes em momentos diferentes na amostra de reação (por exemplo, à medida que uma reação ou processo progride).

Marcadores Luminescentes

[00149] Como usado aqui, um "marcador luminescente" é uma molécula que absorve um ou mais fótons e pode subsequentemente

emitir um ou mais fótons após uma ou mais durações de tempo. Em algumas modalidades, o termo pode ser usado para geralmente se referir a uma porção não reagente de um reagente marcado (por exemplo, um marcador luminescente pode incluir um fluoróforo e ao menos uma porção de um espaçador). Em algumas modalidades, o termo refere-se especificamente à molécula que absorve e/ou emite fótons (por exemplo, o fluoróforo). Em algumas modalidades, o termo é usado de forma intercambiável com "molécula luminescente", dependendo do contexto. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é um fluoróforo (por exemplo, um "corante" ou "corante fluoróforo", como aqui utilizado de forma intercambiável). Em algumas modalidades, o marcador luminescente é uma molécula à base de rodamina. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é uma molécula à base de cianina. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é uma molécula à base de BODIPY.

[00150] Tipicamente, o marcador luminescente compreende um composto aromático ou heteroaromático e pode ser um pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, benzindol, oxazol, carbazol, tiazol, benzotiazol, fenantridina, fenoxazina, porfirina, quinolina, etídio, benzamida, cianina, carbocianina, salicilato, antranilato, cumarina, fluoresceína, rodamina ou outro composto similar. Exemplos de corantes incluem corantes de xanteno, tal como corantes de fluoresceína ou rodamina, incluindo 5-carboxifluoresceína (FAM), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxi-rodamina (R6G), N, N, N', N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX). Exemplos de corantes também incluem corantes de naftilamina que têm um grupo amino na posição alfa ou beta. Por exemplo, os compostos de naftilamino incluem 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato e 2-p-toluidinil-6-naftaleno sulfonato, ácido 5- (2'-ami-

noetil) aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS). Outros exemplos de corantes incluem cumarinas, tal como 3-fenil-7-isocianatocumarina; acridinas, tal como 9-isotiocianatoacridina e acridina laranja; N- (p- (2-benzoxazolil) fenil) maleimida; cianinas, tal como indodicarbocianina 3 (Cy®3), (2Z) -2 - [(E) -3- [3- (5-carboxipentil) -1,1-dimetil-6,8-dissulfobenzo [e] indol- 3-ium-2-il] prop-2-enilideno] -3-etil-1,1-dimetil-8-(trioxidanilsulfanil) benzo [e] indol-6-sulfonato (Cy®3.5), 2- {2- [(2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi] -2-oxoetil} -16,16,18,18-tetrametil-6,7,7a,8a,9,10,16,18-octa-hidrobenzo [2'', 3''] indolizino [8'', 7'': 5', 6'] pirano [3', 2': 3,4] pirido [1,2-a] indol-5-ium-14- sulfonato (Cy®3B), indodicarbocianina 5 (Cy®5), indodicarbocianina 5,5 (Cy®5,5), 3 - (-carboxi-pentil) -3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA); 1H,5H,11H,15H-Xanteno [2,3,4-ij: 5,6,7-i'j'] diquinolizin-18-io, 9- [2 (ou 4) - [[[6-2,5-dioxo-1-pirrolidinil) oxi] -6-oxo-hexil] amino] sulfonil]-4 (ou 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17-octa-hidro- sal interno (TR ou Texas Red®); Corantes BODIPY®; benzoxazois; estilbenos; pirenos; e similares.

[00151] Em certas modalidades, o marcador luminescente é um corante selecionado a partir da Tabela 3. Os corantes listados na Tabela 3 não são limitantes e os marcadores luminescentes do pedido podem incluir corantes não listados na Tabela 3. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de um ou mais nucleotídeos luminescentemente marcados são selecionados a partir da Tabela 3. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de quatro ou mais nucleotídeos luminescentemente marcados são selecionados a partir da Tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de Fluoróforos

Fluoróforos		
5/6-Carboxirodamina 6G	Chromis 678C	DyLight® 655-B1
5-Carboxirodamina 6G	Chromis 678Z	DyLight® 655-B2
6-Carboxirodamina 6G	Chromis 770A	DyLight® 655-B3

<u>Fluoróforos</u>		
6-TAMRA	Chromis 770C	DyLight® 655-B4
Alexa Fluor® 350	Chromis 800A	DyLight® 662Q
Alexa Fluor® 405	Chromis 800C	DyLight® 675-B1
Alexa Fluor® 430	Chromis 830A	DyLight® 675-B2
Alexa Fluor® 480	Chromis 830C	DyLight® 675-B3
Alexa Fluor® 488	Cy®3	DyLight® 675-B4
Alexa Fluor® 514	Cy®3.5	DyLight® 679-C5
Alexa Fluor® 532	Cy®3B	DyLight® 680
Alexa Fluor® 546	Cy®5	DyLight® 683Q
Alexa Fluor® 555	Dyomics-350	DyLight® 690-B1
Alexa Fluor® 568	Dyomics-350XL	DyLight® 690-B2
Alexa Fluor® 594	Dyomics-360XL	DyLight® 696Q
Alexa Fluor® 610-X	Dyomics-370XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 633	Dyomics-375XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 647	Dyomics-380XL	DyLight® 730-B1
Alexa Fluor® 660	Dyomics-390XL	DyLight® 730-B2
Alexa Fluor® 680	Dyomics-405	DyLight® 730-B3
Alexa Fluor® 700	Dyomics-415	DyLight® 730-B4
Alexa Fluor® 750	Dyomics-430	DyLight® 747
Alexa Fluor® 790	Dyomics-431	DyLight® 747-B1
AMCA	Dyomics-478	DyLight® 747-B2
ATTO 390	Dyomics-480XL	DyLight® 747-B3
ATTO 425	Dyomics-481XL	DyLight® 747-B4
ATTO 465	Dyomics-485XL	DyLight® 755
ATTO 488	Dyomics-490	DyLight® 766Q
ATTO 495	Dyomics-495	DyLight® 775-B2
ATTO 514	Dyomics-505	DyLight® 775-B3
ATTO 520	Dyomics-510XL	DyLight® 775-B4
ATTO 532	Dyomics-511XL	DyLight® 780-B1
ATTO 542	Dyomics-520XL	DyLight® 780-B2
ATTO 550	Dyomics-521XL	DyLight® 780-B3
ATTO 565	Dyomics-530	DyLight® 800
ATTO 590	Dyomics-547	DyLight® 830-B2
ATTO 610	Dyomics-547P1	eFluor® 450
ATTO 620	Dyomics-548	Eosin
ATTO 633	Dyomics-549	FITC
ATTO 647	Dyomics-549P1	Fluorescein

<u>Fluoróforos</u>		
ATTO 647N	Dyomics-550	HiLyte™ Fluor 405
ATTO 655	Dyomics-554	HiLyte™ Fluor 488
ATTO 665	Dyomics-555	HiLyte™ Fluor 532
ATTO 680	Dyomics-556	HiLyte™ Fluor 555
ATTO 700	Dyomics-560	HiLyte™ Fluor 594
ATTO 725	Dyomics-590	HiLyte™ Fluor 647
ATTO 740	Dyomics-591	HiLyte™ Fluor 680
ATTO Oxa12	Dyomics-594	HiLyte™ Fluor 750
ATTO Rho101	Dyomics-601XL	IRDye® 680LT
ATTO Rho11	Dyomics-605	IRDye® 750
ATTO Rho12	Dyomics-610	IRDye® 800CW
ATTO Rho13	Dyomics-615	JOE
ATTO Rho14	Dyomics-630	LightCycler® 640R
ATTO Rho3B	Dyomics-631	LightCycler® Red 610
ATTO Rho6G	Dyomics-632	LightCycler® Red 640
ATTO Thio12	Dyomics-633	LightCycler® Red 670
BD Horizon™ V450	Dyomics-634	LightCycler® Red 705
BODIPY® 493/501	Dyomics-635	Lissamine Rhodamine B
BODIPY® 530/550	Dyomics-636	Naftofluoresceína
BODIPY® 558/568	Dyomics-647	Oregon Green® 488
BODIPY® 564/570	Dyomics-647P1	Oregon Green® 514
BODIPY® 576/589	Dyomics-648	Pacific Blue™
BODIPY® 581/591	Dyomics-648P1	Pacific Green™
BODIPY® 630/650	Dyomics-649	Pacific Orange™
BODIPY® 650/665	Dyomics-649P1	PET
BODIPY® FL	Dyomics-650	PF350
BODIPY® FL-X	Dyomics-651	PF405
BODIPY® R6G	Dyomics-652	PF415
BODIPY® TMR	Dyomics-654	PF488
BODIPY® TR	Dyomics-675	PF505
C5.5	Dyomics-676	PF532
C7	Dyomics-677	PF546
CAL Fluor® Gold 540	Dyomics-678	PF555P
CAL Fluor® Green 510	Dyomics-679P1	PF568
CAL Fluor® Orange 560	Dyomics-680	PF594
CAL Fluor® Red 590	Dyomics-681	PF610
CAL Fluor® Red 610	Dyomics-682	PF633P

<u>Fluoróforos</u>		
CAL Fluor® Red 615	Dyomics-700	PF647P
CAL Fluor® Red 635	Dyomics-701	Quasar® 570
Cascade® Blue	Dyomics-703	Quasar® 670
CF™350	Dyomics-704	Quasar® 705
CF™405M	Dyomics-730	Rhoadmine 123
CF™405S	Dyomics-731	Rhodamine 6G
CF™488A	Dyomics-732	Rhodamine B
CF™514	Dyomics-734	Rhodamine Green
CF™532	Dyomics-749	Rhodamine Green-X
CF™543	Dyomics-749P1	Rhodamine Red
CF™546	Dyomics-750	ROX
CF™555	Dyomics-751	ROX
CF™568	Dyomics-752	Seta™ 375
CF™594	Dyomics-754	Seta™ 470
CF™620R	Dyomics-776	Seta™ 555
CF™633	Dyomics-777	Seta™ 632
CF™633-V1	Dyomics-778	Seta™ 633
CF™640R	Dyomics-780	Seta™ 650
CF™640R-V1	Dyomics-781	Seta™ 660
CF™640R-V2	Dyomics-782	Seta™ 670
CF™660C	Dyomics-800	Seta™ 680
CF™660R	Dyomics-831	Seta™ 700
CF™680	DyLight® 350	Seta™ 750
CF™680R	DyLight® 405	Seta™ 780
CF™680R-V1	DyLight® 415-Co1	Seta™ APC-780
CF™750	DyLight® 425Q	Seta™ PerCP-680
CF™770	DyLight® 485-LS	Seta™ R-PE-670
CF™790	DyLight® 488	Seta™646
Chromeo™ 642	DyLight® 504Q	Seta™u 380
Chromis 425N	DyLight® 510-LS	Seta™u 425
Chromis 500N	DyLight® 515-LS	Seta™u 647
Chromis 515N	DyLight® 521-LS	Seta™u 405
Chromis 530N	DyLight® 530-R2	Sulforrodamina 101
Chromis 550A	DyLight® 543Q	TAMRA
Chromis 550C	DyLight® 550	TET
Chromis 550Z	DyLight® 554-R0	Texas Red®
Chromis 560N	DyLight® 554-R1	TMR

Fluoróforos		
Chromis 570N	DyLight® 590-R2	TRITC
Chromis 577N	DyLight® 594	Yakima Yellow™
Chromis 600N	DyLight® 610-B1	Zenon®
Chromis 630N	DyLight® 615-B2	Zy3
Chromis 645A	DyLight® 633	Zy5
Chromis 645C	DyLight® 633-B1	Zy5.5
Chromis 645Z	DyLight® 633-B2	Zy7
Chromis 678A	DyLight® 650	Abberior® Star 635
Square 635	Square 650	Square 660
Square 672	Square 680	Abberior® Star 440SXP
Abberior® Star 470SXP	Abberior® Star 488	Abberior® Star 512
Abberior® Star 520SXP	Abberior® Star 580	Abberior® Star 600
Abberior® Star 635	Abberior® Star 635P	Abberior® Star RED

[00152] Os corantes também podem ser classificados com base no comprimento de onda de absorbância máxima ou luminescência emitida. A Tabela 4 fornece exemplos de fluoróforos agrupados em colunas de acordo com o comprimento de onda aproximado da absorbância máxima. Os corantes listados na Tabela 4 não são limitantes e os marcadores luminescentes do pedido podem incluir corantes não listados na Tabela 4. O comprimento de onda máximo exato da absorbância ou emissão pode não corresponder às faixas espectrais indicadas. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de um ou mais nucleotídeos luminescentemente marcados são selecionados a partir do grupo "Vermelho" listado na Tabela 4. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de um ou mais nucleotídeos luminescentemente marcados são selecionados a partir do grupo "Verde" listado na Tabela 4. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de um ou mais nucleotídeos luminescentemente marcados são selecionados a partir do grupo "Amarelo/Laranja" listado na Tabela 4. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de quatro nucleotídeos são selecionados

de modo que todos sejam selecionados a partir de um dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" ou "Verde" listados na Tabela 4. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de quatro nucleotídeos são selecionados de modo que três sejam selecionados a partir de um primeiro dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" e "Verde" listados na Tabela 4, e o terceiro e o quarto são selecionados a partir de um segundo grupo dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" e "Verde" listados na Tabela 4. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de quatro nucleotídeos são selecionados de modo que dois sejam selecionados a partir de um primeiro dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" e "Verde" listados na Tabela 4, e um terceiro seja selecionado a partir de um segundo grupo dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" e "Verde" listados na Tabela 4 e um quarto seja selecionado a partir de um terceiro grupo dos grupos "Vermelho", "Amarelo/Laranja" e "Verde" listados na Tabela 4.

Tabela 4. Exemplos de fluoróforos por faixa espectral

"Verde" 520 a 570 nm	"Amarelo/Laranja" 570 a 620 nm	"Vermelho" 620 a 670 nm
5/6-Carboxirodamina 6G	Alexa Fluor® 594	Alexa Fluor® 633
6-TAMRA	Alexa Fluor® 610-X	Alexa Fluor® 647
Alexa Fluor® 532	ATTO 590	Alexa Fluor® 660
Alexa Fluor® 546	ATTO 610	ATTO 633
Alexa Fluor® 555	ATTO 620	ATTO 647
Alexa Fluor® 568	BODIPY® 576/589	ATTO 647N
ATTO 520	BODIPY® 581/591	ATTO 655
ATTO 532	CF™ 594	ATTO 665
ATTO 542	CF™ 620R	ATTO 680
ATTO 550	Chromis 570N	ATTO Rho14
ATTO 565	Chromis 577N	BODIPY® 630/650
BODIPY® 530/550	Chromis 600N	BODIPY® 650/665
BODIPY® 558/568	Dyomics-590	CAL Fluor® Red 635
BODIPY® 564/570	Dyomics-591	CF™ 633-V1
CF™ 514	Dyomics-594	CF™ 640R-V1
CF™ 532	Dyomics-601XL	CF™ 633
CF™ 543	Dyomics-605	CF™ 640R
CF™ 546	Dyomics-610	CF™ 640R-V2
CF™ 555	Dyomics-615	CF™ 660C
CF™ 568	DyLight® 590-R2	CF™ 660R
Chromis 530N	DyLight® 594	CF™ 680
Chromis 550A	DyLight® 610-B1	CF™ 680R
Chromis 550C	DyLight® 615-B2	CF™ 680R-V1
Chromis 550Z	HiLyte™ Fluor 594	Chromeo™ 642
Chromis 560N	LightCycler® Red 610	Chromis 630N
Cy®3	PF594	Chromis 645A
Cy®3.5	PF594	Chromis 645A
Cy®3B	PF610	Chromis 645C
Dyomics-530	Quasar® 570	Chromis 645Z

"Verde" 520 a 570 nm	"Amarelo/Laranja" 570 a 620 nm	"Vermelho" 620 a 670 nm
Dyomics-547	Abberior® Star 580	Cy@5
Dyomics-547P1	Abberior® Star 600	Cy@5.5
Dyomics-548		Dyomics-630
Dyomics-549P1		Dyomics-631
Dyomics-550		Dyomics-632
Dyomics-554		Dyomics-633
Dyomics-555		Dyomics-634
Dyomics-556		Dyomics-635
Dyomics-560		Dyomics-636
DyLight® 521-LS		Dyomics-647
DyLight® 530-R2		Dyomics-647P1
DyLight® 543Q		Dyomics-648
DyLight® 550		Dyomics-648P1
DyLight® 554-R0		Dyomics-649
DyLight® 554-R1		Dyomics-649P1
HiLyte™ Fluor 532		Dyomics-650
HiLyte™ Fluor 555		Dyomics-651
PF532		Dyomics-652
PF546		Dyomics-654
PF555P		DyLight® 633
PF568		DyLight® 633-B1
Seta™ 555		DyLight® 633-B2
Abberior® Star 520SXP		DyLight® 650
		DyLight® 655-B1
		DyLight® 655-B2
		DyLight® 655-B3
		DyLight® 655-B4
		DyLight® 662Q
		DyLight® 680
		DyLight® 683Q
		HiLyte™ Fluor 647
		HiLyte™ Fluor 680
		LightCycler® 640R
		LightCycler® Red 640
		LightCycler® Red 670
		PF633P
		PF647P
		Quasar® 670
		Seta™ 632
		Seta™ 633
		Seta™ 650
		Seta™ 660
		Seta™ 670
		Seta™ Tau 647
		Square 635
		Square 650
		Square 660
		Abberior® Star 635
		Abberior® Star 635P
		Abberior® Star RED

[00153] Em certas modalidades, o marcador luminescente pode compreender um primeiro e um segundo cromóforo. Em algumas modalidades, um estado excitado do primeiro cromóforo é capaz de relaxamento via transferência de energia para o segundo cromóforo. Em algumas modalidades, a transferência de energia é uma

transferência de energia de ressonância de Förster (FRET). Tal par FRET pode ser útil para fornecer um marcador luminescente com propriedades que facilitam a diferenciação do marcador dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes. Em certas modalidades, o par FRET pode absorver energia de excitação em uma primeira faixa espectral e emitir luminescência em uma segunda faixa espectral.

[00154] Em algumas modalidades, o marcador luminescente é acoplado dentro de uma molécula de ligante aqui descrita (por exemplo, integrada a um ligante oligomérico ou polimérico). A Tabela 5 fornece vários exemplos de fluoróforos compatíveis com essa estratégia de conjugação no contexto de uma fita de oligonucleotídeo. Como mostrado, os fluoróforos à base de cianina na Tabela 5 são conjugados com uma extremidade 3' de uma porção da primeira fita e uma extremidade 5' de uma porção da segunda fita, de modo que o próprio fluoróforo faça parte da ligação covalente dentro da fita de oligonucleotídeo (por exemplo, o marcador luminescente é acoplado sem o uso de espaçador). Dever-se-ia apreciar que, em algumas modalidades, esses e outros tipos similares de fluoróforos podem ser ligados dentro de qualquer classe de estrutura oligomérica ou polimérica. Por exemplo, em algumas modalidades, um fluoróforo é ligado dentro de um peptídeo por conjugação a uma extremidade C-terminal de uma primeira porção de peptídeo e uma extremidade N-terminal de uma segunda porção de peptídeo. Em algumas modalidades, uma única molécula de ligante compreende dois ou mais fluoróforos conectados dentro do ligante (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais de seis corantes ligados dentro de um único ligante). Em algumas modalidades, um ligante compreende um ou mais fluoróforos ligados dentro do ligante e um ou mais fluoróforos conectados através de um espaçador. Por exemplo, em algumas modalidades, um reagente brilhantemente marcado aqui descrito compreende um ou mais

Em algumas modalidades, o segundo cromóforo de um par FRET emite fótons em uma faixa espectral distinta de uma pluralidade de outras moléculas luminescentemente marcadas. Em algumas modalidades, o primeiro cromóforo de um par FRET tem uma vida útil de luminescência distinta de uma pluralidade de moléculas luminescentemente marcadas. Em certas modalidades, o par FRET pode absorver energia de excitação em uma faixa espectral distinta de uma pluralidade de outras moléculas luminescentemente marcadas. Em certas modalidades, o par FRET pode absorver energia de excitação na mesma faixa espectral que uma ou mais dentre uma pluralidade de outras moléculas luminescentemente marcadas.

[00156] Para reações de sequenciamento, certas combinações de reagentes brilhantemente marcados podem ser preferenciais. Em algumas modalidades, ao menos um dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de cianina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, ao menos um dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de rodamina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos dois dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de cianina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos dois dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de rodamina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos três dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de cianina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos três dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de rodamina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos quatro dos reagentes brilhantemente marcados compreende um corante de cianina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de ao menos quatro dos reagentes

brilantemente marcados compreende um corante de rodamina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um dos três reagentes brilantemente marcados compreende um corante cianina, ou um análogo do mesmo, e um quarto reagente marcado brilhantemente compreende um corante de rodamina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de dois dos reagentes brilantemente marcados compreende um corante de cianina, ou um análogo do mesmo, e um terceiro e, opcionalmente, um quarto reagente brilantemente marcado compreende um corante de rodamina, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, cada um de três dos reagentes brilantemente marcados compreende um corante de rodamina, ou análogo do mesmo, e um terceiro e, opcionalmente, um quarto reagente brilantemente marcado compreende um corante de cianina, ou um análogo do mesmo.

[00157] Como descrito aqui, um marcador luminescente é uma molécula que absorve um ou mais fótons e pode subsequentemente emitir um ou mais fótons após uma ou mais durações de tempo. A luminescência da molécula é descrita por vários parâmetros, incluindo, entre outros, vida útil de luminescência, espectros de absorção, espectros de emissão, rendimento quântico luminescente e intensidade de luminescência. Os termos absorção e excitação são usados de forma intercambiável em todo o pedido. Em algumas modalidades, os termos luminescência e emissão são usados de forma intercambiável. Uma molécula luminescente típica pode absorver ou sofrer excitação pela luz em múltiplos comprimentos de onda. A excitação em certos comprimentos de onda ou dentro de certas faixas espectrais pode relaxar por um evento de emissão luminescente, enquanto a excitação em certos outros comprimentos de onda ou faixas espectrais pode não relaxar por um evento de emissão luminescente. Em algumas modalidades, uma molécula luminescente é apenas ade-

quadamente excitada para luminescência em um único comprimento de onda ou dentro de uma única faixa espectral. Em algumas modalidades, uma molécula luminescente é adequadamente excitada para luminescência em dois ou mais comprimentos de onda ou dentro de duas ou mais faixas espectrais. Em algumas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o comprimento de onda do fóton de excitação ou do espectro de absorção.

[00158] O fóton emitido a partir de um evento de emissão luminescente será emitido em um comprimento de onda dentro de uma faixa espectral de possíveis comprimentos de onda. Tipicamente, o fóton emitido tem um comprimento de onda maior (por exemplo, tem menos energia ou é deslocado para vermelho) em comparação com o comprimento de onda do fóton de excitação. Em certas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o comprimento de onda de um fóton emitido. Em certas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o comprimento de onda de uma pluralidade de fótons emitidos. Em certas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o espectro de emissão.

[00159] A vida útil de luminescência refere-se à duração de tempo entre um evento de excitação e um evento de emissão. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência é expressa como a constante em uma equação de decaimento exponencial. Em algumas modalidades em que há um ou mais eventos de pulso que fornecem energia de excitação, a duração do tempo é o tempo entre o pulso e o evento de emissão subsequente.

[00160] A determinação de uma vida útil de luminescência de uma molécula pode ser realizada usando qualquer método adequado (por exemplo, medindo-se a vida útil usando uma técnica adequada ou determinando-se características de emissão dependentes do tempo). Em algumas modalidades, determinar a vida útil de luminescência de

uma molécula compreende determinar a vida útil em relação a uma ou mais moléculas (por exemplo, diferentes nucleosídeos polifosfatos luminescentemente marcados em uma reação de sequenciamento). Em algumas modalidades, determinar a vida útil de luminescência de uma molécula compreende determinar a vida útil em relação a uma referência. Em algumas modalidades, determinar a vida útil de luminescência de uma molécula compreende medir a vida útil (por exemplo, vida útil de fluorescência). Em algumas modalidades, determinar a vida útil de luminescência de uma molécula compreende determinar uma ou mais características temporais que são indicativas da vida útil. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência de uma molécula pode ser determinada com base na distribuição de uma pluralidade de eventos de emissão (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 eventos de emissão ou mais) ocorrendo em uma ou mais janelas temporizadas em relação a um pulso de excitação. Por exemplo, uma vida útil de luminescência de uma única molécula pode ser diferenciada de uma pluralidade de moléculas com diferentes vidas úteis de luminescência com base na distribuição dos tempos de chegada de fótons medidos em relação a um pulso de excitação.

[00161] Dever-se-ia considerar que uma vida útil de luminescência de uma única molécula é indicativa do tempo dos fótons emitidos após a única molécula atingir um estado excitado e a única molécula pode ser distinguida por informações indicativas do tempo dos fótons. Algumas modalidades podem incluir distinguir uma molécula a partir de uma pluralidade de moléculas com base na vida útil de luminescência da molécula medindo-se os tempos associados aos fótons emitidos pela molécula. A distribuição dos tempos pode fornecer uma indicação da vida útil de luminescência que pode ser determinada a partir da distribuição. Em algumas modalidades, a única

molécula é distinguível da pluralidade de moléculas com base na distribuição dos tempos, tal como comparando a distribuição dos tempos com uma distribuição de referência correspondente a uma molécula conhecida. Em algumas modalidades, um valor para a vida útil de luminescência é determinado a partir da distribuição dos tempos.

[00162] O rendimento quântico luminescente refere-se à fração de eventos de excitação em um determinado comprimento de onda ou dentro de uma determinada faixa espectral que leva a um evento de emissão e é tipicamente menor que 1. Em algumas modalidades, o rendimento quântico luminescente de uma molécula aqui descrita está entre 0 e cerca de 0,001, entre cerca de 0,001 e cerca de 0,01, entre cerca de 0,01 e cerca de 0,1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, entre cerca de 0,5 e 0,9 ou entre cerca de 0,9 e 1. Em algumas modalidades, uma molécula é identificada determinando-se ou estimando-se o rendimento quântico luminescente.

[00163] Como aqui utilizado para únicas moléculas, a intensidade de luminescência refere-se ao número de fótons emitidos por unidade de tempo que são emitidos por uma molécula que está sendo excitada pela entrega de uma energia de excitação pulsada. Em algumas modalidades, a intensidade de luminescência refere-se ao número detectado de fótons emitidos por unidade de tempo que são emitidos por uma molécula que está sendo excitada pela entrega de uma energia de excitação pulsada, e são detectados por um sensor ou conjunto de sensores específico.

[00164] A vida útil de luminescência, o rendimento quântico luminescente e a intensidade de luminescência podem variar para uma dada molécula em diferentes condições. Em algumas modalidades, uma única molécula terá uma vida útil de luminescência observada, rendimento quântico luminescente ou intensidade de luminescência

diferente do que para um conjunto de moléculas. Em algumas modalidades, uma molécula confinada em um poço de amostra terá uma vida útil de luminescência observada, rendimento quântico luminescente ou intensidade de luminescência diferente do que para moléculas não confinadas em um poço de amostra. Em algumas modalidades, um marcador luminescente ou molécula luminescente ligada a outra molécula terá uma vida útil de luminescência, rendimento quântico luminescente ou intensidade de luminescência diferente que o marcador luminescente ou molécula luminescente não ligada a outra molécula. Em algumas modalidades, uma molécula que interage com um complexo macromolecular terá vida útil de luminescência, rendimento quântico luminescente ou intensidade de luminescência diferente do que uma molécula que não interage com um complexo macromolecular.

[00165] Em certas modalidades, uma molécula luminescente descrita no pedido absorve um fóton e emite um fóton após uma duração de tempo. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência de uma molécula pode ser determinada ou estimada medindo-se a duração de tempo. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência de uma molécula pode ser determinada ou estimada medindo-se uma pluralidade de durações de tempo para múltiplos eventos de pulso e eventos de emissão. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência de uma molécula pode ser diferenciada dentre as vidas úteis de luminescência de uma pluralidade de tipos de moléculas, medindo-se a duração de tempo. Em algumas modalidades, a vida útil de luminescência de uma molécula pode ser diferenciada dentre as vidas úteis de luminescência de uma pluralidade de tipos de moléculas, medindo-se uma pluralidade de durações de tempo para vários eventos de pulso e eventos de emissão. Em certas modalidades, uma molécula é identificada ou diferenciada dentre uma

pluralidade de tipos de moléculas, determinando-se ou estimando-se a vida útil de luminescência da molécula. Em certas modalidades, uma molécula é identificada ou diferenciada dentre uma pluralidade de tipos de moléculas, diferenciando-se a vida útil de luminescência da molécula dentre uma pluralidade de vidas úteis de luminescência de uma pluralidade de tipos de moléculas.

[00166] Em certas modalidades, o evento de emissão luminescente é uma fluorescência. Em certas modalidades, o evento de emissão luminescente é uma fosforescência. Como aqui utilizado, o termo luminescência abrange todos os eventos luminescentes, incluindo fluorescência e fosforescência.

Sequenciamento

[00167] Alguns aspectos do pedido são úteis para sequenciar polímeros biológicos, tal como ácidos nucleicos e proteínas. Em alguns aspectos, as composições e técnicas descritas no pedido podem ser usadas para identificar uma série de monômeros de nucleotídeo ou aminoácido que são incorporados a um ácido nucleico ou proteína (por exemplo, detectando-se um período de tempo de incorporação de uma série de monômeros de nucleotídeos ou aminoácidos marcados). Em algumas modalidades, as composições e técnicas descritas no pedido podem ser usadas para identificar uma série de nucleotídeos que são incorporados a um produto de reação de sequenciamento de ácido nucleico dependente de modelo sintetizado por uma enzima polimerase.

[00168] Após o pareamento de bases entre uma nucleobase de um ácido nucleico alvo e o nucleosídeo polifosfato complementar (por exemplo, dNTP), a polimerase incorpora o dNTP na fita de ácido nucleico recém-sintetizada, formando uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' hidroxila da fita recém-sintetizada e o alfa fosfato do dNTP. Em exemplos nos quais o marcador luminescente conjugado ao

dNTP (por exemplo, através de um ligante do pedido) é um fluoróforo, sua presença é sinalizada por excitação e um pulso de emissão é detectado durante e/ou após a etapa de incorporação. Para marcadores de detecção (por exemplo, marcadores luminescentes) que são conjugados, através de um ligante do pedido, ao fosfato terminal (gama) do dNTP, a incorporação do dNTP na fita recém-sintetizada resulta na liberação dos fosfatos beta e gama e do ligante compreendendo o marcador de detecção, que é livre para se difundir no poço de amostra, resultando em uma diminuição na emissão detectada a partir do fluoróforo.

[00169] Em certas modalidades, o produto da reação de sequenciamento de ácido nucleico dependente do modelo é sintetizado em uma reação de sequenciamento realizada por polimerases de ácido nucleico de ocorrência natural. Em algumas modalidades, a polimerase é uma variante mutante ou modificada de uma polimerase de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o produto de sequenciamento de ácido nucleico dependente do modelo compreenderá um ou mais segmentos nucleotídicos complementares à cadeia de ácido nucleico do modelo. Em um aspecto, o pedido fornece um método para determinar a sequência de uma fita de ácido nucleico modelo (ou alvo), determinando a sequência da sua fita de ácido nucleico complementar.

[00170] O termo "polimerase", como usado aqui, geralmente se refere a qualquer enzima (ou enzima de polimerização) capaz de catalisar uma reação de polimerização. Exemplos de polimerases incluem, sem limitação, uma polimerase de ácido nucleico, uma transcriptase ou uma ligase. Uma polimerase pode ser uma enzima de polimerização. As modalidades direcionadas para a extensão de ácido nucleico de molécula única (por exemplo, para sequenciamento de ácido nucleico) podem usar qualquer polimerase que seja capaz de sintetizar um ácido nucleico complementar a uma molécula de ácido

nucleico alvo. Em algumas modalidades, uma polimerase pode ser uma DNA polimerase, uma RNA polimerase, uma transcriptase reversa e/ou uma forma mutante ou alterada de uma ou mais delas.

[00171] Exemplos de polimerases incluem, mas não estão limitados a uma DNA polimerase, uma RNA polimerase, uma polimerase termoestável, uma polimerase de ocorrência natural, uma polimerase modificada, DNA polimerase I de *E. coli*, DNA polimerase T7, DNA polimerase T4 de bacteriófago, DNA polimerase $\phi 29$ (phi29), Taq polimerase, Tth polimerase, Tli polimerase, Pfu polimerase, Pwo polimerase, VENT polimerase, DEEPVENT polimerase, EX-Taq polimerase, LA-Taq polimerase, Sso polimerase, Poc polimerase, Pab polimerase, Mth polimerase, ES4 polimerase, Tru polimerase, Tac polimerase, Tne polimerase, Tma polimerase, Tca polimerase, Tih polimerase, Tfi polimerase, Platinum Taq polimerase, Tbr polimerase, Tfl polimerase, Tth polimerase, Pfuturbo polimerase, Pyrobest polimerase, Pwo polimerase, KOD polimerase, Bst polimerase, Sac polimerase, fragmento Klenow, polimerase com atividade de 3' a 5' exonuclease, e variantes, produtos modificados e seus derivados. Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase de subunidade única. Exemplos não limitantes de DNA polimerases e suas propriedades são descritos em detalhes em, entre outros lugares, DNA Replication 2ª edição, Kornberg e Baker, W.H. Freeman, Nova Iorque, N.Y (1991).

[00172] Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com alta processabilidade. No entanto, em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com processabilidade reduzida. A processabilidade da polimerase geralmente se refere à capacidade de uma polimerase incorporar consecutivamente dNTPs em um modelo de ácido nucleico sem liberar o modelo de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com baixa atividade de

5'-3' exonuclease e/ou 3'-5' exonuclease. Em algumas modalidades, a polimerase é modificada (por exemplo, por substituição de aminoácidos) para ter atividade reduzida de 5'-3' exonuclease e/ou atividade de 3'-5' em relação a uma polimerase de ocorrência natural correspondente. Outros exemplos não limitantes de DNA polimerases incluem DNA polimerase 9° Nm™ (New England Biolabs), e um mutante P680G da exo-polimerase Klenow (Tuske e outros (2000) JBC 275 (31): 23759 a 23768). Em algumas modalidades, uma polimerase com processabilidade reduzida fornece precisão aumentada para modelos de sequenciamento contendo uma ou mais extensões de repetições de nucleotídeos (por exemplo, duas ou mais bases sequenciais do mesmo tipo). Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase que tem uma afinidade maior por um nucleotídeo marcado do que por um ácido nucleico não marcado.

[00173] Em outro aspecto, o pedido fornece métodos de sequenciamento de ácidos nucleicos alvo sequenciando uma pluralidade de fragmentos de ácidos nucleicos, em que o ácido nucleico alvo compreende os fragmentos. Em certas modalidades, o método compreende combinar uma pluralidade de sequências de fragmentos para fornecer uma sequência ou sequência parcial para o ácido nucleico alvo de origem. Em algumas modalidades, a etapa de combinação é realizada por hardware e software do computador. Os métodos descritos neste documento podem permitir que um conjunto de ácidos nucleicos alvo relacionados, tal como um cromossomo ou genoma integral a ser sequenciado.

[00174] Durante o sequenciamento, uma enzima de polimerização pode se acoplar (por exemplo, anexar) a uma localização de iniciação de uma molécula de ácido nucleico alvo. A localização de iniciação pode ser um iniciador que é complementar a uma porção da molécula de ácido nucleico alvo. Como uma alternativa, a localização de

iniciação é uma brecha ou corte que é fornecido dentro de um segmento de fita dupla da molécula de ácido nucleico alvo. Uma brecha ou corte pode ter de 0 a ao menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 ou 40 nucleotídeos de comprimento. Um corte pode fornecer uma quebra em uma fita de uma sequência de fita dupla, que pode fornecer uma localização de iniciação para uma enzima de polimerização, tal como, por exemplo, uma enzima polimerase de deslocamento de fita.

[00175] Em alguns casos, um iniciador de sequenciamento pode ser anelado em uma molécula de ácido nucleico alvo que pode ou não ser imobilizada em um suporte sólido. Um suporte sólido pode compreender, por exemplo, um poço de amostra (por exemplo, uma nanoabertura, uma câmara de reação) em um chip usado para sequenciamento de ácido nucleico. Em algumas modalidades, um iniciador de sequenciamento pode ser imobilizado em um suporte sólido e a hibridização da molécula de ácido nucleico alvo também imobiliza a molécula de ácido nucleico alvo no suporte sólido. Em algumas modalidades, uma polimerase é imobilizada em um suporte sólido e o iniciador solúvel e o ácido nucleico alvo entram em contato com a polimerase. No entanto, em algumas modalidades, um complexo compreendendo uma polimerase, um ácido nucleico alvo e um iniciador é formado em solução e o complexo é imobilizado em um suporte sólido (por exemplo, via imobilização da polimerase, iniciador e/ou ácido nucleico alvo). Em algumas modalidades, nenhum dos componentes em um poço de amostra (por exemplo, uma nanoabertura, uma câmara de reação) é imobilizado em um suporte sólido. Por exemplo, em algumas modalidades, um complexo compreendendo uma polimerase, um ácido nucleico alvo e um iniciador é formado em solução e o complexo não é imobilizado em um suporte sólido.

[00176] Sob condições apropriadas, uma enzima polimerase que

entra em contato com um iniciador/ácido nucleico alvo anelado pode adicionar ou incorporar um ou mais nucleotídeos no iniciador, e os nucleotídeos podem ser adicionados ao iniciador em um modelo de 5' a 3', molde-dependente. Essa incorporação de nucleotídeos em um iniciador (por exemplo, através da ação de uma polimerase) pode geralmente ser chamada de uma reação de extensão do iniciador. Cada nucleotídeo pode ser associado a um marcador detectável que pode ser detectado e identificado (por exemplo, com base em sua vida útil de luminescência e/ou outras características) durante a reação de extensão de ácido nucleico e usado para determinar cada nucleotídeo incorporado no iniciador estendido e, assim, uma sequência da molécula de ácido nucleico recém-sintetizada. Por complementaridade de sequência da molécula de ácido nucleico recém-sintetizada, a sequência da molécula de ácido nucleico alvo também pode ser determinada. Em alguns casos, o anelamento de um iniciador de sequenciamento em uma molécula de ácido nucleico alvo e a incorporação de nucleotídeos no iniciador de sequenciamento podem ocorrer em condições de reação similares (por exemplo, a mesma temperatura de reação ou similar) ou em condições de reação diferentes (por exemplo, diferentes temperaturas de reação). Em algumas modalidades, o sequenciamento por métodos de síntese pode incluir a presença de uma população de moléculas de ácido nucleico alvo (por exemplo, cópias de um ácido nucleico alvo) e/ou uma etapa de amplificação do ácido nucleico alvo para atingir uma população de ácidos nucleicos alvo. No entanto, em algumas modalidades, o sequenciamento por síntese é usado para determinar a sequência de uma única molécula em cada reação que está sendo avaliada (e a amplificação de ácido nucleico não é necessária para preparar o modelo alvo para o sequenciamento). Em algumas modalidades, uma pluralidade de reações de sequenciamento de molécula única é

realizada em paralelo (por exemplo, em um único chip) de acordo com aspectos do presente pedido. Por exemplo, em algumas modalidades, uma pluralidade de reações de sequenciamento de molécula única é realizada em câmaras de reação separadas (por exemplo, nanoaberturas, poços de amostra) em um único chip.

[00177] As modalidades são capazes de sequenciar moléculas únicas de ácido nucleico com alta precisão e longos comprimentos de leitura, como uma precisão de ao menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999% ou 99,9999% e/ou comprimentos de leitura maiores ou iguais a cerca de 10 pares de bases (bp), 50 bp, 100 bp, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 1000 pb, 10.000 pb, 20.000 pb, 30.000 pb, 40.000 pb, 50.000 pb ou 100.000 pb. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico alvo usada no sequenciamento de molécula única é um modelo de ácido nucleico alvo de fita simples (por exemplo, ácido desoxirribonucleico (DNA), derivados de DNA, ácido ribonucleico (RNA), derivados de RNA) que é adicionado ou imobilizado a um poço de amostra (por exemplo, nanoabertura) contendo ao menos um componente adicional de uma reação de sequenciamento (por exemplo, uma polimerase tal como uma DNA polimerase, um iniciador de sequenciamento) imobilizado ou acoplado a um suporte sólido, tal como as paredes inferiores ou laterais do poço de amostra. A molécula de ácido nucleico alvo ou a polimerase pode ser acoplada a uma parede de amostra, tal como nas paredes inferiores ou laterais da amostra, diretamente ou através de um ligante. O poço de amostra (por exemplo, nanoabertura) também pode conter quaisquer outros reagentes necessários para a síntese de ácidos nucleicos por meio de uma reação de extensão de iniciador, tal como, por exemplo, tampões adequados, cofatores, enzimas (por exemplo, uma polimerase) e desoxirribonucleosídeo polifosfatos dNTPs, tal como, por exemplo,

desoxirribonucleosídeos trifosfatos, incluindo desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxiguanosina trifosfato (dGTP), desoxiuridina trifosfato (dUTP), desoxitimidina trifosfato (dTTP), que incluem marcadores luminescentes, tal como fluoróforos, que podem ser conectados aos dNTPs por meio de um ligante do pedido. Em algumas modalidades, cada classe de dNTPs (por exemplo, dNTPs contendo adenina (por exemplo, dATP), dNTPs contendo citosina (por exemplo, dCTP), dNTPs contendo guanina (por exemplo, dGTP), dNTPs contendo uracila (por exemplo, dUTPs) e dNTPs contendo timina (por exemplo, dTTP)) é conjugada (por exemplo, através de um ligante do pedido) a um marcador luminescente distinto, de modo que a detecção da luz emitida pelo marcador indique a identidade do dNTP que foi incorporado no ácido nucleico recém-sintetizado. Um "marcador luminescente distinto" pode, em algumas modalidades, referir-se a um dNTP que compreende um marcador luminescente diferente (por exemplo, um fluoróforo diferente) de outro dNTP. Em algumas modalidades, um marcador luminescente distinto refere-se a um dNTP que compreende um número diferente do mesmo marcador luminescente ou similar a outro dNTP. Em algumas modalidades, um marcador luminescente distinto refere-se a um dNTP que compreende uma ou mais propriedades de luminescência que são detectavelmente diferentes de outro dNTP. A luz emitida a partir do marcador luminescente pode ser detectada e atribuída ao seu marcador luminescente apropriado (e, portanto, ao dNTP associado) por meio de qualquer dispositivo e/ou método adequado. O marcador luminescente pode ser conjugado (por exemplo, através de um ligante do pedido) ao dNTP em qualquer posição, de modo que a presença do marcador luminescente não iniba a incorporação do dNTP na fita do ácido nucleico recém-sintetizado ou na atividade da polimerase. Em algumas modalidades, o marcador

luminescente é conjugado (por exemplo, através de um ligante do pedido) ao fosfato terminal (por exemplo, o gama fosfato) do dNTP.

[00178] Em algumas modalidades, o modelo de ácido nucleico alvo de fita simples pode entrar em contato com um iniciador de sequenciamento, dNTPs, polimerase e outros reagentes necessários para a síntese de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, todos os dNTPs apropriados podem entrar em contato com o modelo de ácido nucleico alvo de fita simples simultaneamente (por exemplo, todos os dNTPs estão presentes simultaneamente), de modo que a incorporação de dNTPs possa ocorrer continuamente. Em outras modalidades, os dNTPs podem entrar em contato com o modelo de ácido nucleico alvo de fita simples sequencialmente, onde o modelo de ácido nucleico alvo de fita simples é colocado em contato com cada dNTP apropriado separadamente, com etapas de lavagem entre o contato do modelo de ácido nucleico alvo de fita simples com dNTPs diferentes. Esse ciclo de contato do modelo de ácido nucleico alvo de fita simples com cada dNTP separadamente seguido de lavagem pode ser repetido para cada posição base sucessiva do modelo de ácido nucleico alvo de fita simples a ser identificado.

[00179] Em algumas modalidades, o iniciador de sequenciamento anela com o modelo de ácido nucleico alvo de fita simples e a polimerase incorpora consecutivamente os dNTPs (ou outro nucleosídeo polifosfato) ao iniciador com base no modelo de ácido nucleico alvo de fita simples. O marcador luminescente exclusivo associado a cada dNTP incorporado pode ser excitado com a luz de excitação apropriada durante ou após a incorporação do dNTP ao iniciador e a sua emissão pode ser detectada subsequentemente, usando qualquer dispositivo e/ou método adequado. A detecção de uma emissão de luz particular (por exemplo, tendo uma vida útil de emissão, intensidade, espectro particular e/ou combinação dos mesmos) pode ser atribuída a

um dNTP particular incorporado. A sequência obtida a partir da coleção de marcadores luminescentes detectados pode então ser usada para determinar a sequência do modelo de ácido nucleico alvo de fita simples via complementaridade de sequência.

[00180] Em algumas modalidades, a presente descrição fornece métodos e composições que podem ser vantajosamente utilizados nas tecnologias descritas nos Pedido de Patente U.S. copendente. Nos.: 14/543.865, 14/543.867, 14/543.888, 14/821.656, 14/821.686, 14/821.688, 15/161.067, 15/161.088, 15/161.125, 15/255.245, 15/255.303, 15/255.624, 15/261.697, 15/261.724, 15/600.979, 15/846.967, 15/847.001, 15/971.493, 62/289.019, 62/296.546, 62/310.398, 62/339.790, 62/343.997, 62/344.123 e 62/426.144, cujo conteúdo de cada um deles é incorporado aqui por referência.

Kits

[00181] Em ainda outros aspectos, o pedido fornece kits para sequenciar um ácido nucleico modelo. Em algumas modalidades, um kit compreende uma pluralidade de tipos de nucleotídeos luminescentemente marcados, como aqui descrito. Em algumas modalidades, cada tipo de nucleotídeo marcado compreende dois ou mais marcadores luminescentes ligados a um ou mais nucleosídeo polifosfato por meio de um ligante de acordo com o pedido. Em algumas modalidades, a pluralidade de nucleotídeos é selecionada a partir dos nucleotídeos marcados representados nas Figuras 3A-3C, 3E-3G, 4A-4C, 5A-5B, 6A-6C e 8-10. Por exemplo, em algumas modalidades, a pluralidade de nucleotídeos é projetada de acordo com as estruturas mostradas na Figura 3G. Em algumas modalidades, a pluralidade de nucleotídeos é projetada de acordo com as estruturas mostradas na Figura 3B (306), na Figura 3B (308) e na Figura 5A (502). Em algumas modalidades, o kit compreende ainda uma enzima de polimerização (por exemplo, uma DNA polimerase, como aqui descrito em outro

lugar). Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um iniciador complementar ao ácido nucleico modelo que está sendo sequenciado.

[00182] Em alguns aspectos, o pedido fornece misturas de reação compreendendo um ou mais dos reagentes brilhantemente marcados descritos aqui. Em algumas modalidades, a mistura de reação compreende uma mistura adicionada a uma reação de sequenciamento. Em algumas modalidades, a mistura de reação inclui uma enzima de polimerização. Em algumas modalidades, a enzima de polimerização é configurada para ser imobilizada em um suporte sólido (por exemplo, o fundo de um poço de amostra, como descrito em outro lugar neste documento). Em algumas modalidades, a mistura de reação compreende um ácido nucleico modelo a ser sequenciado. Em algumas modalidades, a mistura de reação compreende um iniciador complementar a uma porção do ácido nucleico modelo. Em algumas modalidades, a mistura de reação compreende um ou mais componentes necessários para iniciar uma reação de sequenciamento (por exemplo, um íon de metal divalente, tal como magnésio ou ferro). Em algumas modalidades, a mistura de reação compreende um ou mais componentes necessários para estabilizar uma reação de sequenciamento (por exemplo, um ou mais agentes tampão, um ou mais agentes de redução, etc.).

EXEMPLOS

Exemplo 1: Estratégias de acoplamento de corantes com ligantes de ácidos nucleicos

[00183] Várias tecnologias de sequenciamento de próxima geração implementam componentes de reação marcados. Por exemplo, nucleotídeos marcados com corante podem ser usados para fazer chamadas de base específicas durante eventos de incorporação com base na detecção ou observação de propriedades de luminescência únicas correspondentes a cada tipo de base. Essas propriedades, tal

como vida útil e intensidade, devem, portanto, ser prontamente identificáveis para cada base entre um conjunto. Os esforços iniciais para aumentar a intensidade de fluorescência dos nucleotídeos marcados revelaram que o brilho de um nucleotídeo marcado com corante foi aumentado quando uma segunda molécula de corante foi adicionada ao construto. No entanto, a vida útil de fluorescência diminuiu visivelmente em relação à variante marcada individualmente. No desenvolvimento de nucleotídeos marcados melhorados, os ácidos nucleicos foram investigados como estruturas de núcleo para ligar corantes fluorescentes a nucleotídeos.

[00184] Uma fonte potencial de vida útil de fluorescência alterada em nucleotídeos multiplamente marcados é a extensão da interação entre moléculas de corante do mesmo construto, o que pode resultar em um efeito de complexação. Esta possibilidade foi explorada ainda mais através da geração dos nucleotídeos marcados com corante mostrados na Figura 8. Duas moléculas de corante (DyLight 530R2) foram conectadas a um nucleosídeo polifosfato através de um ligante de ácido nucleico. Uma fita de oligonucleotídeo não marcada foi hibridizada com a fita de oligonucleotídeo marcada para conferir rigidez no ligante de ácido nucleico. Um primeiro construto 800 foi feito usando espaçadores C6-amino-T para acoplamento de corante ao ácido nucleico, e um segundo construto 802 foi feito usando espaçadores de glicolamina para acoplamento de corante.

[00185] A análise do primeiro construto revelou uma vida útil de fluorescência de aproximadamente 1,4 ns, enquanto o segundo construto exibiu uma vida útil de aproximadamente 3,5 ns. O aumento medido na vida útil com o segundo construto foi atribuído ao uso de espaçadores relativamente mais curtos para acoplamento de corante em comparação com o primeiro construto. Como mostrado na Figura 8, os espaçadores C6-amino-T do primeiro construto são de maior

comprimento que os espaçadores de glicolamina do segundo construto. Uma explicação possível para a vida útil aprimorada do segundo construto é que o comprimento menor do espaçador diminuiu as interações corante - corante, limitando a extensão na qual as faixas de movimento dos corantes acoplados se sobrepõem.

Exemplo 2: Maior rigidez do ligante prolonga a vida útil de fluorescência

[00186] Após observações de que o comprimento do espaçador pode afetar a vida útil de fluorescência, potencialmente devido à sobreposição espacial de corantes, pensava-se que um arranjo simétrico de corantes em uma molécula multiplamente marcada poderia ter efeitos similares. Um ligante de ácido nucleico em forma de Y foi gerado e é mostrado na Figura 9. O construto inicial tinha três fitas de oligonucleotídeo covalentemente ligadas através do ligante ramificado mostrado. Cada um das duas fitas foi conectada terminalmente a uma molécula de corante (Chromis 530N), enquanto a terceira fita foi conectada terminalmente a um nucleosídeo polifosfato. A terceira fita foi ainda hibridizada com uma fita não marcada para conferir rigidez entre o nucleosídeo polifosfato e a região marcada. Uma segunda versão deste construto foi gerada por hibridização com o componente de oligonucleotídeo 902, que hibridiza com a primeira e a segunda fita.

[00187] A análise do construto inicial revelou uma vida útil de fluorescência de aproximadamente 2,3 ns, enquanto o construto tendo o componente de oligonucleotídeo adicional 902 exibiu uma vida útil de aproximadamente 4,2 ns. Uma explicação potencial para o aumento medido na vida útil com o último construto é que o componente de oligonucleotídeo 902 confere rigidez na região marcada. A rigidez aumentada poderia promover a separação do corante, restringindo cada corante a uma faixa de movimento mais limitada.

Exemplo 3: Efeitos do comprimento do espaçador de corante nas

configurações do ligante restrito

[00188] As configurações de ligantes geometricamente restritas foram posteriormente desenvolvidas através da geração do construto marcado com corante tris mostrado na Figura 10. Como mostrado, a porção do ligante de ácido nucleico inclui três componentes de oligonucleotídeo principais. O primeiro componente incluiu quatro fitas de oligonucleotídeo acopladas covalentemente através do ligante ramificado de quatro vias mostrado. Cada uma dessas três destas fitas foi ligada terminalmente a uma molécula de corante (AttoRho6G), enquanto a quarta fita foi hibridizada com um segundo componente de oligonucleotídeo. O segundo componente de oligonucleotídeo foi conectado terminalmente a dois nucleosídeo polifosfatos por meio do ligante ramificado mostrado. O terceiro componente de oligonucleotídeo, que incluía três fitas de oligonucleotídeo ligadas covalentemente por meio do ligante ramificado mostrado, foi hibridizado com os três fitas marcadas com corante do primeiro componente para conferir rigidez na região marcada. Dois construtos com corante tris separados com diferentes comprimentos de espaçador foram gerados de acordo com a área em caixa mostrada na Figura 10.

[00189] O primeiro construto de nucleotídeo marcado com corante tris tendo um espaçador mais longo (ver Figura 10, área em caixa, superior) mostrou um triplo na intensidade da fluorescência em relação a um construto de nucleotídeo marcado com um corante. Além disso, observou-se que a vida útil foi levemente reduzida quando comparada a um construto de nucleotídeo com dois corantes, com a mesma molécula de corante (não mostrada). As medições obtidas para o segundo construto de nucleotídeo marcado com corante tris tendo um espaçador mais curto (ver Figura 10, área em caixa, inferior) mostraram um ligeiro aumento na vida útil de fluorescência em relação ao primeiro construto marcado com corante tris.

[00190] Os nucleotídeos marcados com corante tris anteriores produziram várias vidas úteis durante as reações de sequenciamento, o que se pensava ser o resultado de dois corantes interagindo para produzir uma primeira vida útil, enquanto o corante não interagindo produzia uma segunda vida útil. De forma importante, apenas uma única vida útil foi observada para qualquer molécula marcada com corante tris mostrada na Figura 10 durante as reações de sequenciamento.

EQUIVALENTES E ESCOPO

[00191] Embora várias modalidades da invenção tenham sido descritas e ilustradas neste documento, aqueles versados na técnica vislumbram prontamente uma variedade de outros meios e/ou estruturas para desempenhar a função e/ou obter os resultados e/ou uma ou mais das vantagens aqui descritas e cada uma dessas variações e/ou modificações é considerada como estando dentro do escopo das modalidades da invenção aqui descritas. De um modo mais geral, os versados na técnica apreciarão prontamente que todos os parâmetros, dimensões, materiais e configurações aqui descritos devem ser exemplificativos e que os parâmetros, dimensões, materiais e/ou configurações reais dependerão da aplicação ou aplicações específicas para as quais os ensinamentos da invenção são usados. Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descritas. Entende-se, portanto, que as modalidades anteriores são apresentadas apenas a título de exemplo e que, dentro do escopo das reivindicações em anexo e equivalentes, as modalidades da invenção podem ser praticadas de outra forma que não como especificamente descrito e reivindicado. As modalidades da invenção da presente descrição são direcionadas a cada recurso, sistema, artigo, material, kit e/ou método individual aqui descrito. Além

disso, qualquer combinação de dois ou mais desses recursos, sistemas, artigos, materiais, kits e/ou métodos, se tais recursos, sistemas, artigos, materiais, kits e/ou métodos não forem mutuamente inconsistentes, está incluída no escopo da invenção da presente descrição.

[00192] Todas as definições, conforme aqui definidas e usadas, devem ser entendidas como controlando sobre as definições de dicionário, definições em documentos incorporados por referência, e/ou significados comuns dos termos definidos.

[00193] Todas as referências, patentes e pedidos de patente aqui descritos são incorporados por referência no que diz respeito ao assunto para o qual cada um é citado, o que em alguns casos pode abranger a totalidade do documento.

[00194] Os artigos indefinidos "um" e "uma", conforme aqui utilizados na especificação e nas reivindicações, a menos que claramente indicado o contrário, devem ser entendidos como "ao menos um".

[00195] A frase "e/ou", conforme usada aqui na especificação e nas reivindicações, deve ser entendida como significando "um ou ambos" os elementos combinados, isto é, elementos que estão conjuntamente presentes em alguns casos e disjuntivamente presente em outros casos. Vários elementos listados com "e/ou" devem ser interpretados da mesma maneira, isto é, "um ou mais" dos elementos combinados. Outros elementos podem opcionalmente estar presentes, exceto os elementos especificamente identificados pela cláusula "e/ou", se relacionados ou não a esses elementos especificamente identificados. Assim, como um exemplo não limitante, uma referência a "A e/ou B", quando usada em conjunto com linguagem aberta como "compreendendo", pode se referir, em uma modalidade, apenas a A (opcionalmente incluindo elementos que não B); em outra modalidade, apenas a B (opcionalmente incluindo elementos que não A); em ainda outra modalidade, a A e B (incluindo opcionalmente outros elementos); etc.

[00196] Conforme usado aqui na especificação e nas reivindicações, "ou" deve ser entendido como tendo o mesmo significado que "e/ou" como definido acima. Por exemplo, ao separar itens em uma lista, "ou" ou "e/ou" devem ser interpretados como inclusivos, ou seja, a inclusão de ao menos um, mas também incluindo mais de um, de um número ou lista de elementos, e, opcionalmente, itens não listados adicionais. Somente termos claramente indicados ao contrário, tal como "apenas um de" ou "exatamente um de" ou, quando usados nas reivindicações, "consistindo de", se referirão à inclusão de exatamente um elemento de um número ou lista de elementos. Em geral, o termo "ou", conforme usado neste documento, deve ser interpretado apenas como indicando alternativas exclusivas (ou seja, "um ou outro, mas não ambos") quando precedido por termos de exclusividade, como "qualquer um", "um de", "apenas um de" ou "exatamente um de". "Consistindo essencialmente de", quando usado nas reivindicações, terá seu significado comum, conforme usado no campo do direito de patentes.

[00197] Como usado aqui na especificação e nas reivindicações, a frase "ao menos um", em referência a uma lista de um ou mais elementos, deve ser entendida como significando ao menos um elemento selecionado a partir de qualquer um ou mais dos elementos na lista de elementos, mas não necessariamente incluindo ao menos um de cada elemento listado especificamente na lista de elementos e não excluindo nenhuma combinação de elementos na lista de elementos. Essa definição também permite que elementos podem opcionalmente estar presentes, além dos elementos especificamente identificados na lista de elementos a que a frase "ao menos um" se refere, relacionada ou não a esses elementos especificamente identificados. Assim, como um exemplo não limitante, "ao menos um de A e B" (ou, equivalentemente, "ao menos um de A ou B" ou, equivalen-

temente, "ao menos um de A e/ou B") pode se referir, em uma modalidade, a ao menos um, incluindo opcionalmente mais de um, A, sem B presente (e opcionalmente incluindo elementos que não B); em outra modalidade, a ao menos um, incluindo opcionalmente mais de um, B, sem A presente (e opcionalmente incluindo elementos que não A); em ainda outra modalidade, a ao menos um, incluindo opcionalmente mais de um, A e ao menos um, incluindo opcionalmente mais de um, B (e opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[00198] Dever-se-ia entender também que, a menos que seja claramente indicado ao contrário, em qualquer método aqui reivindicado que inclua mais de uma etapa ou ação, a ordem das etapas ou ações do método não está necessariamente limitada à ordem na qual as etapas ou ações do método são citadas.

[00199] Nas reivindicações, bem como na especificação acima, todas as frases de transição, tal como "compreendendo", "incluindo", "transportando", "tendo", "contendo", "envolvendo", "retendo", "composto de" e similares devem ser entendidas como abertas, ou seja, como incluindo, mas não se limitadas. Somente as frases de transição "consistindo de" e "consistindo essencialmente de" devem ser frases de transição fechadas ou semifechadas, respectivamente, conforme estabelecido no United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Seção 2111.03. Dever-se-ia apreciar que as modalidades descritas neste documento usando uma frase de transição em aberto (por exemplo, "compreendendo") também são consideradas, em modalidades alternativas, como "consistindo de" e "consistindo essencialmente de" o recurso descrito pelo frase de transição aberta. Por exemplo, se a descrição descreve "uma composição compreendendo A e B", a descrição também considera as modalidades alternativas "uma composição consistindo de A e B" e "uma composição consistindo essencialmente de A e B".

REIVINDICAÇÕES

1. Nucleotídeo marcado, compreendendo um nucleotídeo conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante, caracterizado pelo fato de que cada marcador luminescente está ao menos 5 angstroms separado de qualquer outro marcador luminescente.

2. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada marcador luminescente compreende um centro de massa que está ao menos 5 angstroms separado do centro de massa de qualquer outro marcador luminescente.

3. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um ou mais marcadores luminescentes são acoplados ao ligante através de uma molécula espaçadora que compreende ao menos 8 átomos contíguos entre o marcador luminescente e um sítio de ligação no ligante.

4. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a molécula espaçadora compreende menos de 50, menos de 40, menos de 30 ou menos de 20 átomos contíguos entre o marcador luminescente e o sítio de ligação no ligante.

5. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um ou mais marcadores luminescentes são integrados no ligante.

6. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o ligante é um oligômero que compreende ao menos 10 unidades monoméricas.

7. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o oligômero compreende menos de 150, menos de 100 ou menos de 50 unidades monoméricas.

8. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 7, caracterizado pelo fato de que um ou mais

marcadores luminescentes são acoplados ao ligante em um sítio de ligação que está ao menos 5 unidades monoméricas separado de qualquer outro sítio de ligação.

9. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o ligante é um ácido nucleico.

10. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende DNA, RNA, PNA, LNA ou um derivado do mesmo.

11. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o ligante é um peptídeo.

12. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o peptídeo é restrito em conformação via ciclização e/ou modificação de poliprolina.

13. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o ligante é um polissacarídeo.

14. Nucleotídeo marcado, compreendendo um nucleotídeo conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante, caracterizado pelo fato de que o ligante é um ácido nucleico compreendendo uma primeira fita de oligonucleotídeo acoplada aos dois ou mais marcadores luminescentes em dois ou mais sítios de ligação na primeira fita de oligonucleotídeo, e em que cada marcador luminescente compreende um volume estérico tendo um ponto central que está ao menos 5 angstroms separados do ponto central de qualquer outro marcador luminescente.

15. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma segunda fita de oligonucleotídeo hibridizada com a primeira fita de oligonucleotídeo, em

que a primeira fita de oligonucleotídeo está ligada ao nucleotídeo.

16. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma segunda fita de oligonucleotídeo hibridizada com a primeira fita de oligonucleotídeo, em que a segunda fita de oligonucleotídeo está ligada ao nucleotídeo.

17. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de que os dois ou mais sítios de ligação são separados um do outro por ao menos 5 bases na primeira fita de oligonucleotídeo.

18. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 17, caracterizado pelo fato de que os dois ou mais sítios de ligação são separados um do outro por ao menos 5 e menos de 50 bases na primeira fita de oligonucleotídeo.

19. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, caracterizado pelo fato de que cada sítio de ligação é ao menos 2 bases separado de uma guanina ou citosina na primeira fita de oligonucleotídeo.

20. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 19, caracterizado pelo fato de que ao menos um sítio de ligação ocorre em um sítio abásico na primeira fita de oligonucleotídeo.

21. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 20, caracterizado pelo fato de que ao menos um sítio de ligação ocorre em uma nucleobase na primeira fita de oligonucleotídeo.

22. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a nucleobase é selecionada a partir de uma nucleobase A, T ou U.

23. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 22, caracterizado pelo fato de que a primeira fita de

oligonucleotídeo forma uma ou mais hastes - alças.

24. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que uma região de alça de cada haste - alça compreende um sítio de ligação dos dois ou mais sítios de ligação.

25. Nucleotídeo marcado de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a região de alça de cada haste - alça compreende ao menos 4 bases não pareadas.

26. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 25, caracterizado pelo fato de que a região de alça compreende uma sequência com menos de 33% de conteúdo de G/C.

27. Nucleotídeo marcado, caracterizado pelo fato de que compreende um nucleotídeo conectado a dois ou mais marcadores luminescentes por meio de um ligante, em que o ligante é um ácido nucleico compreendendo:

uma primeira fita de oligonucleotídeo ligada a duas ou mais fitas de oligonucleotídeo ramificadas em uma extremidade terminal do primeiro oligonucleotídeo por meio de um composto de acoplamento covalente, cada fita de oligonucleotídeo ramificada tendo um marcador luminescente; e

uma segunda fita de oligonucleotídeo ligada a um nucleotídeo, em que a segunda fita de oligonucleotídeo é hibridizada com a primeira fita de oligonucleotídeo.

28. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que cada fita de oligonucleotídeo ramificada é ainda hibridizada com uma fita de oligonucleotídeo ramificada complementar.

29. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 28, caracterizado pelo fato de que o composto de acoplamento covalente é de uma estrutura:

31. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o marcador luminescente é um corante fluorescente.

32. Nucleotídeo marcado, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o corante fluorescente é um corante de rodamina, um corante BODIPY, ou um corante de cianina.

33. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo está ao menos 1 nm separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes.

34. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo está separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes entre aproximadamente 1 e 10 nm.

35. Nucleotídeo marcado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo está separado de qualquer marcador luminescente dos dois ou mais marcadores luminescentes entre aproximadamente 2 e 20 nm.

36. Método para determinar a sequência de um ácido nucleico modelo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) expor um complexo em um volume alvo, o complexo compreendendo o ácido nucleico modelo, um iniciador, e uma enzima de polimerização, a um ou mais tipos diferentes de nucleotídeos luminescentemente marcados, em que cada tipo de nucleotídeo luminescentemente marcado compreende um nucleotídeo marcado de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 35;

(ii) direcionar uma série de pulsos de uma ou mais energias de excitação para uma vizinhança do volume alvo;

(iii) detectar uma pluralidade de fótons emitidos a partir de nucleotídeos luminescentemente marcados durante a incorporação

sequencial em um ácido nucleico compreendendo o iniciador; e

(iv) identificar a sequência de nucleotídeos incorporados, determinando o tempo e opcionalmente a intensidade de luminescência dos fótons emitidos.

37. Kit para sequenciar um ácido nucleico modelo, caracterizado pelo fato de que compreende:

dois ou mais tipos diferentes de nucleotídeos luminescentemente marcados, em que cada tipo de nucleotídeo marcado luminescentemente compreende um nucleotídeo marcado de como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 35.

38. Kit, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma enzima de polimerização.

39. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 38, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um iniciador complementar ao ácido nucleico modelo.

40. Composição de reação de sequenciamento de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que compreende dois ou mais tipos diferentes de nucleotídeos luminescentemente marcados em uma mistura de reação, em que cada tipo de nucleotídeo luminescentemente marcado compreende um nucleotídeo marcado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 35.

41. Composição, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma enzima de polimerização.

42. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ácido nucleico modelo.

43. Composição, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um iniciador complementar ao ácido nucleico modelo.

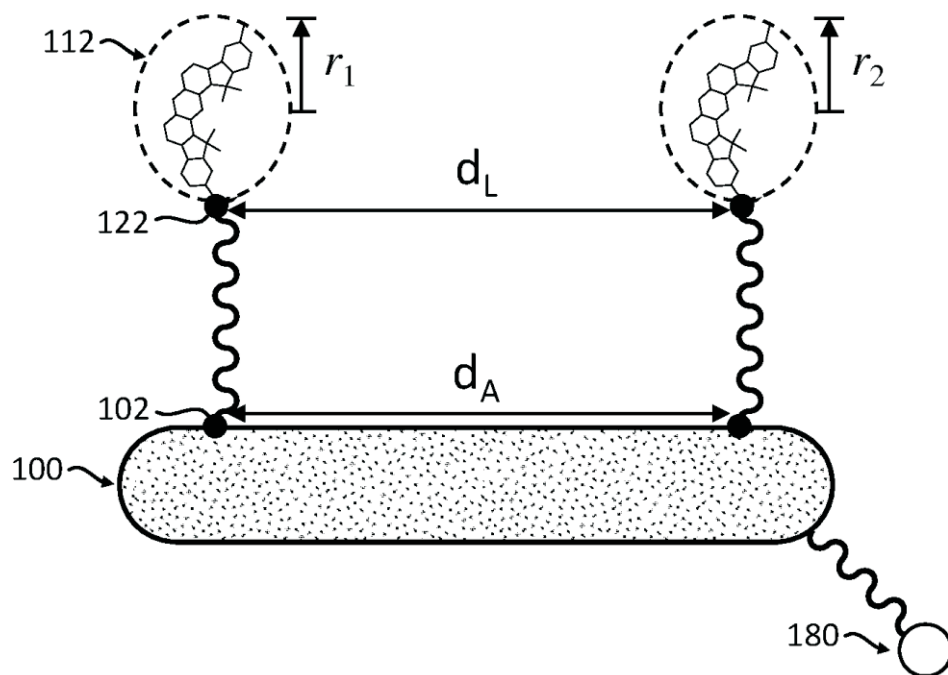


FIG. 1A

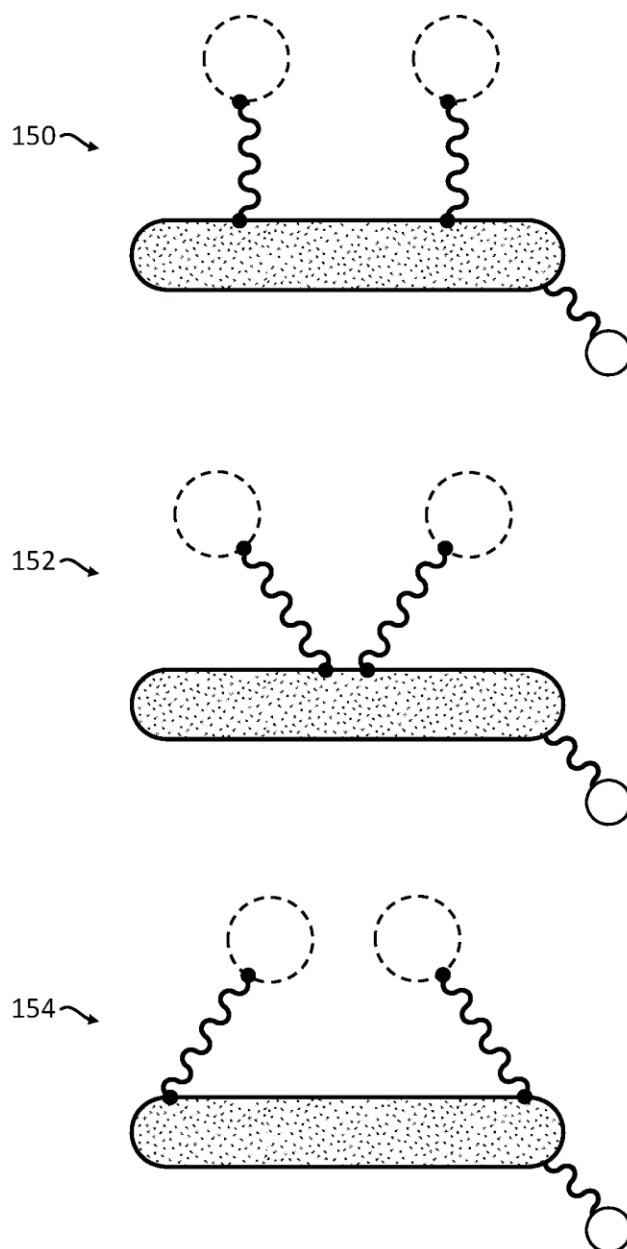


FIG. 1B

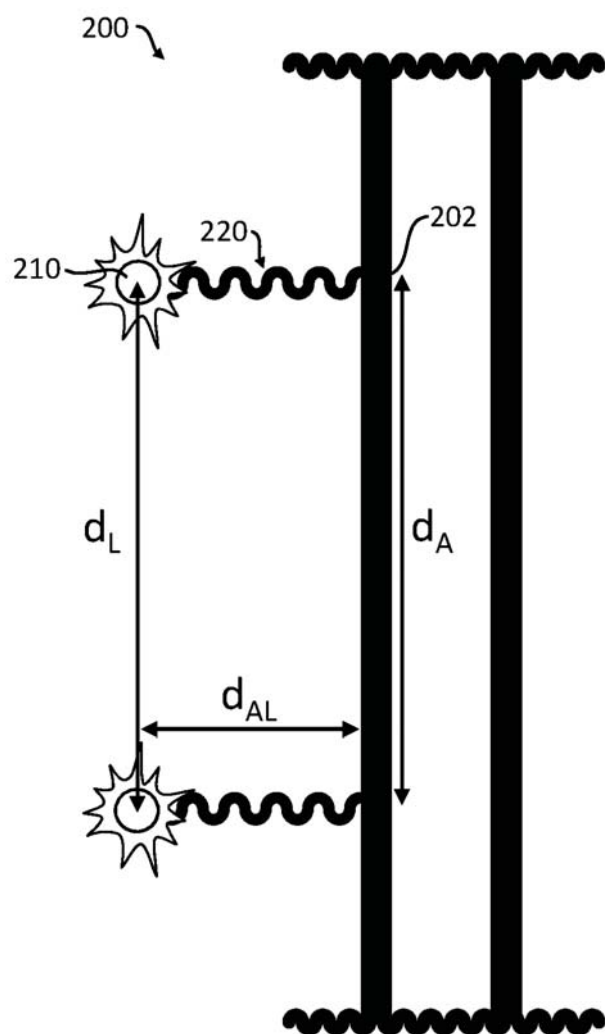


FIG. 2A

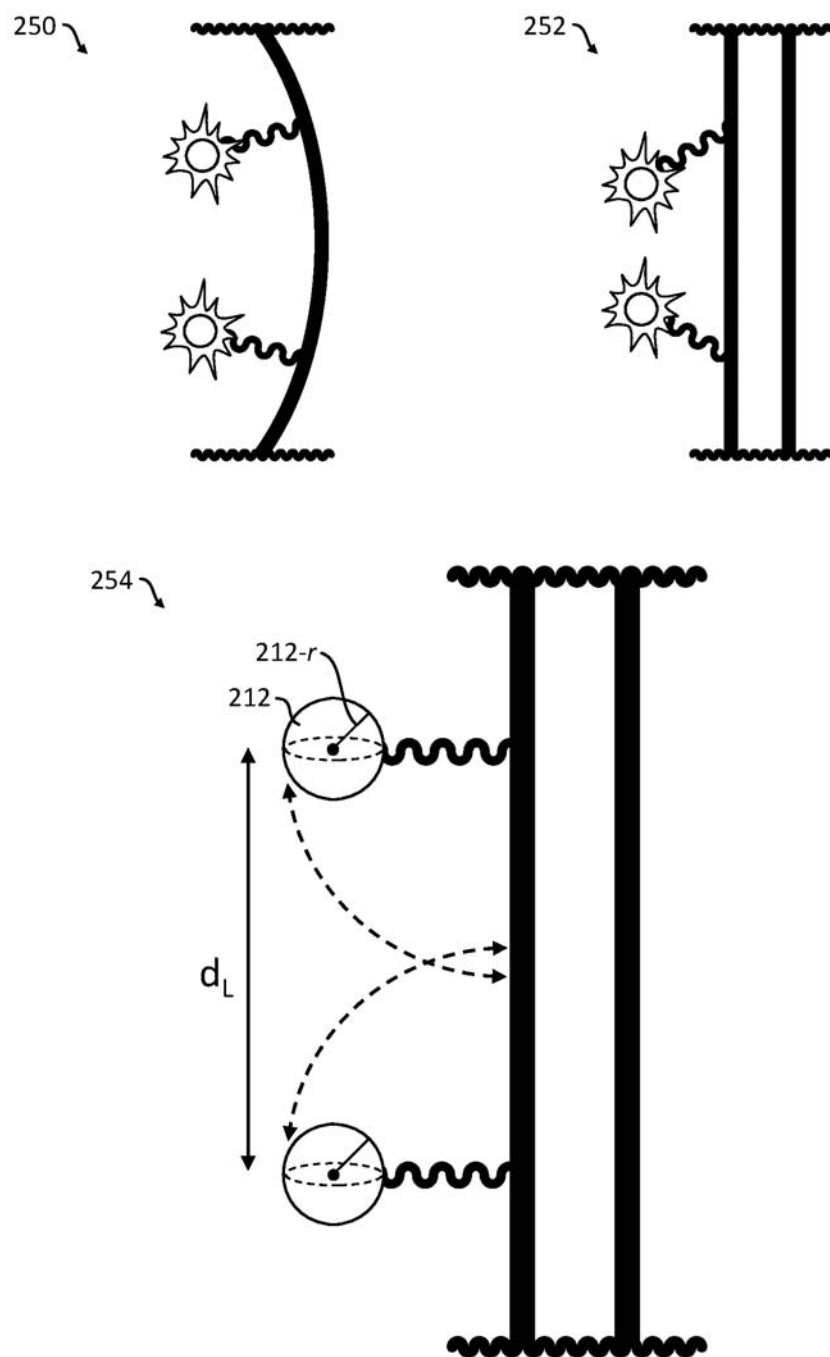


FIG. 2B

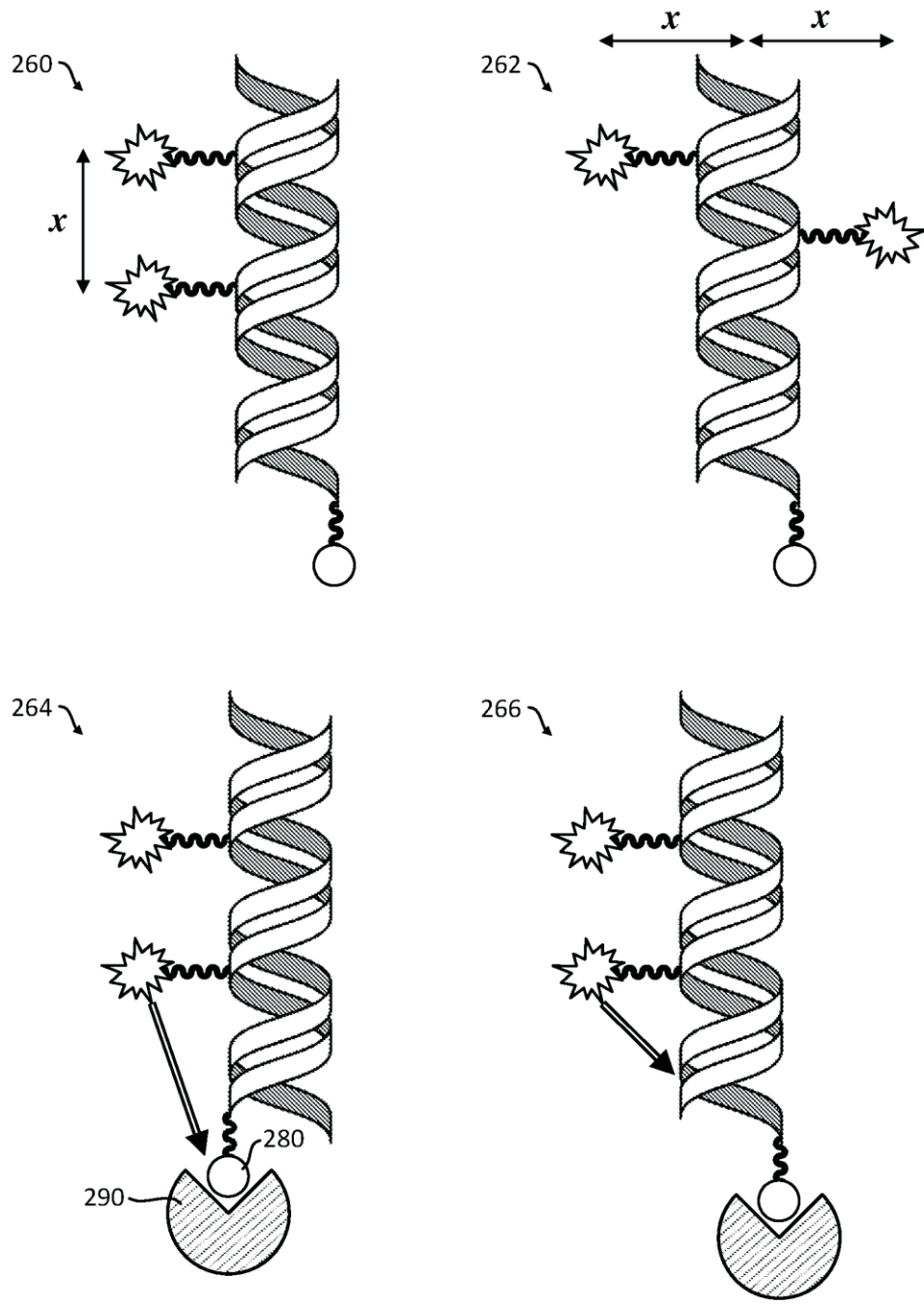


FIG. 2C

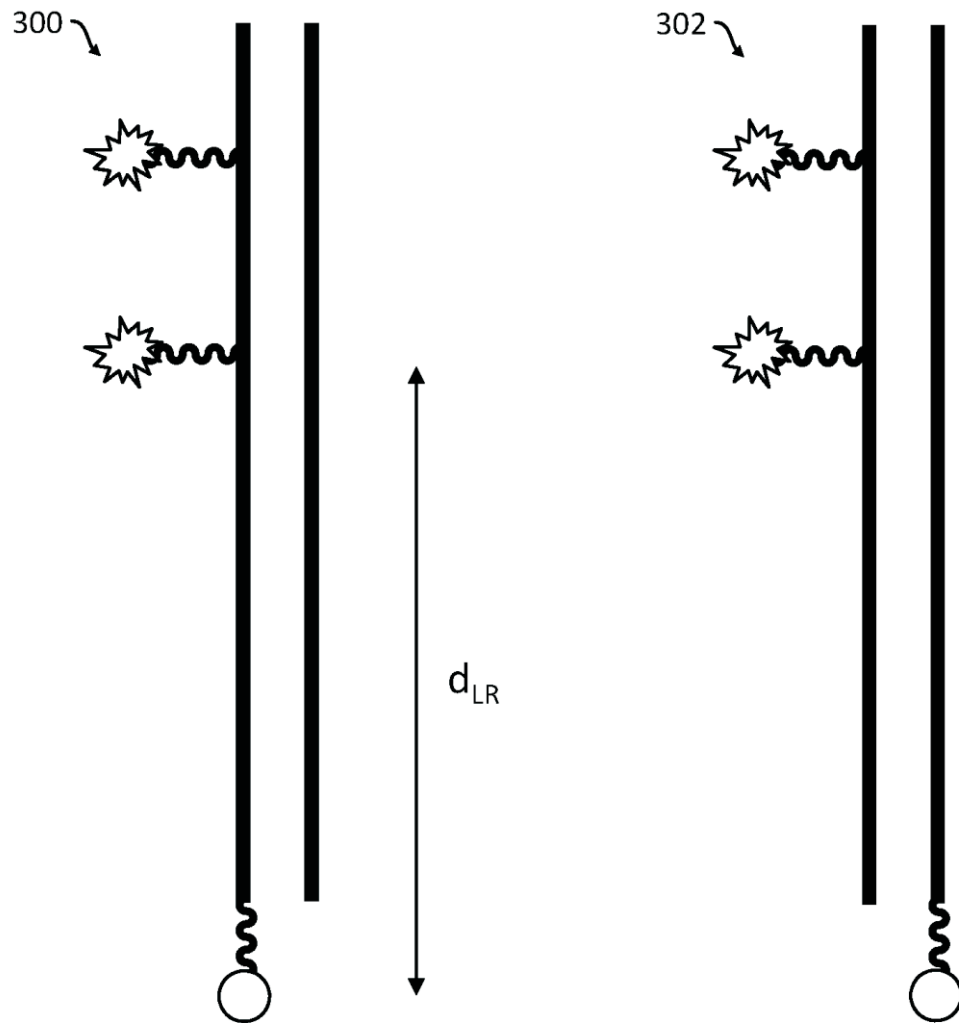


FIG. 3A

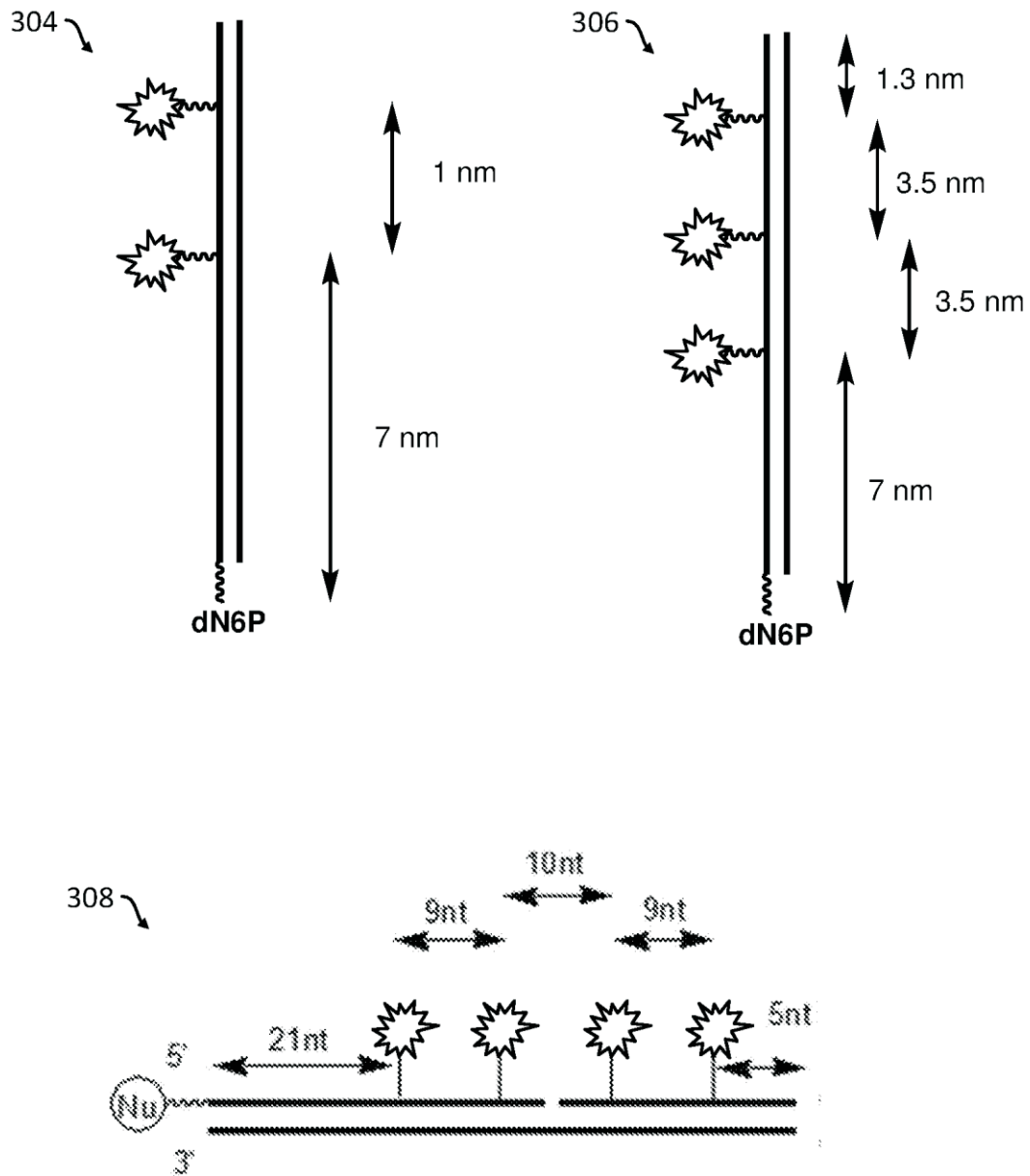


FIG. 3B



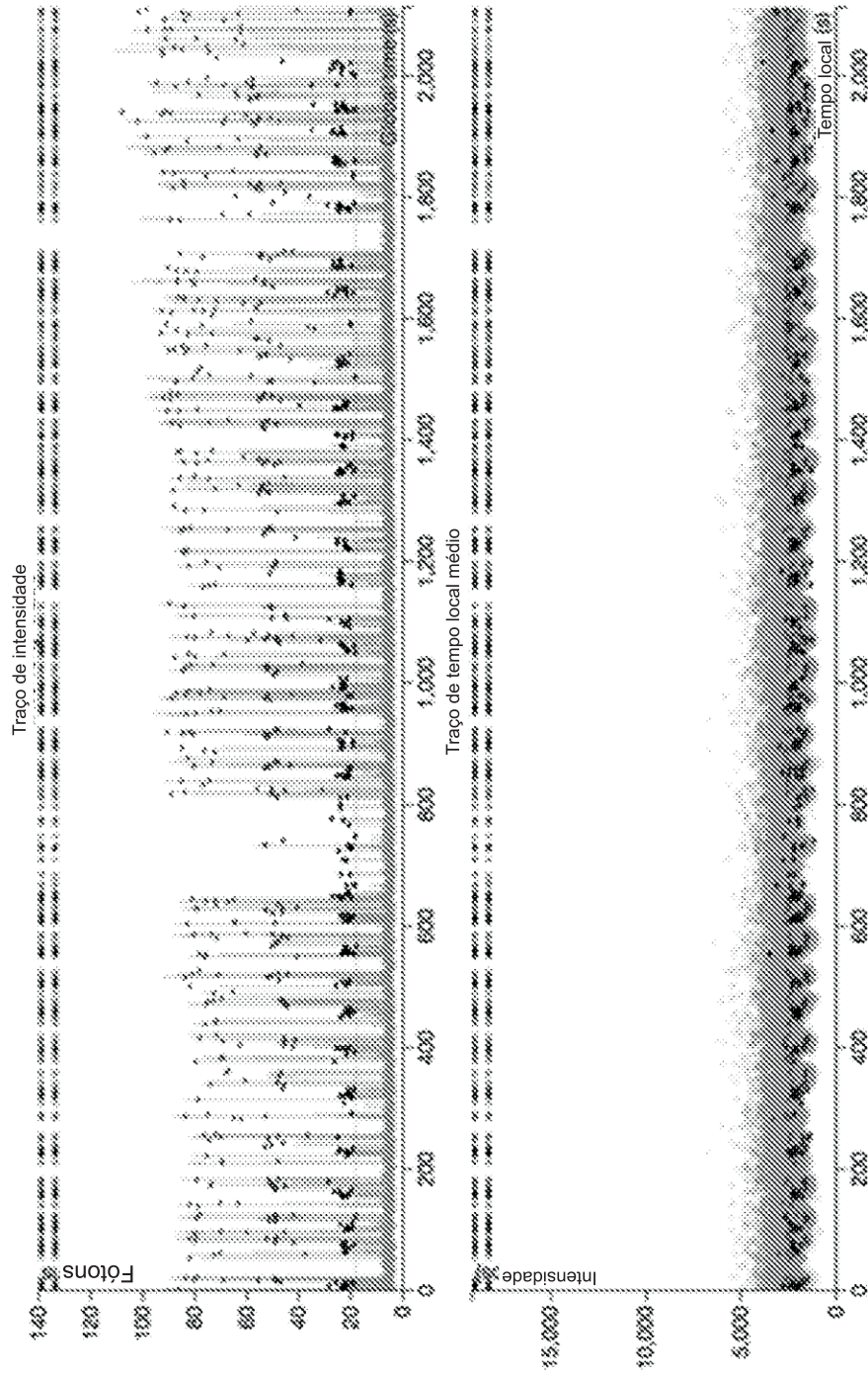


FIG. 3D

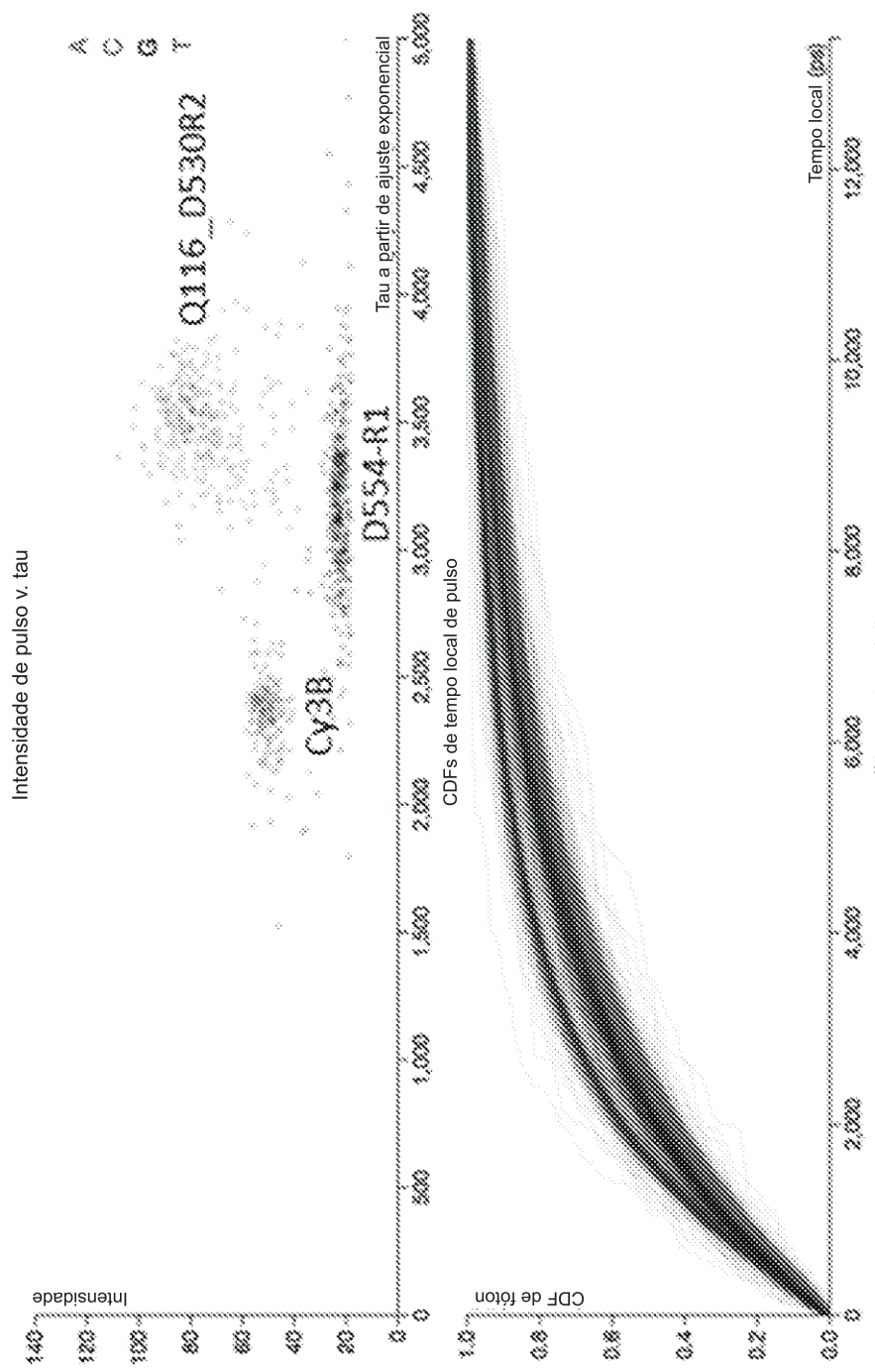
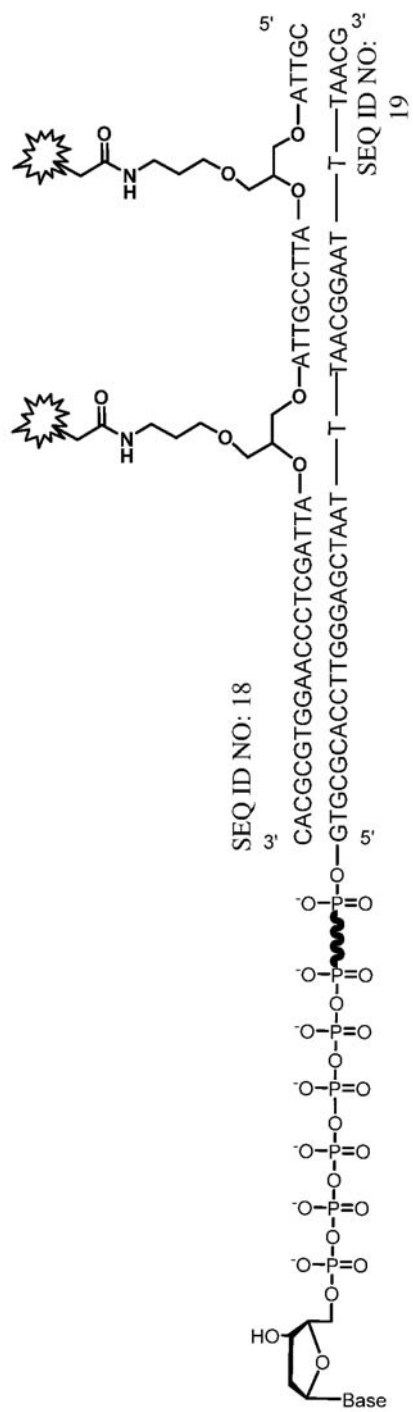


FIG. 3D (CONT)

FIG. 3E



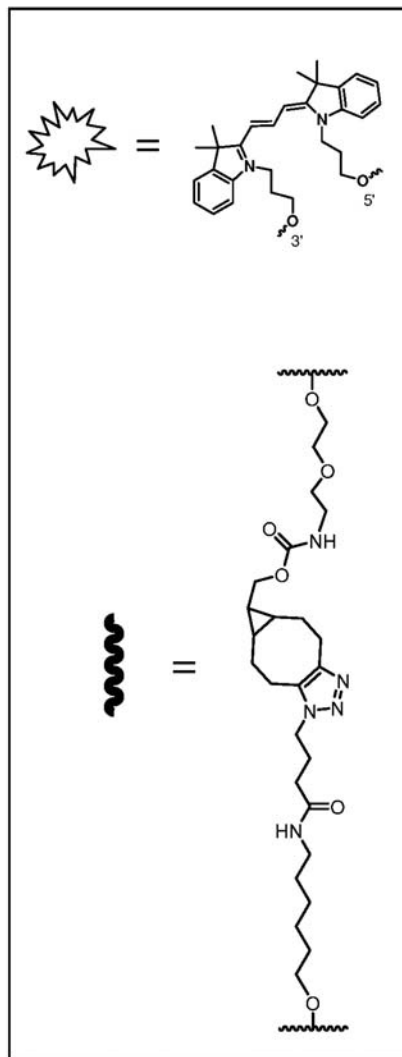
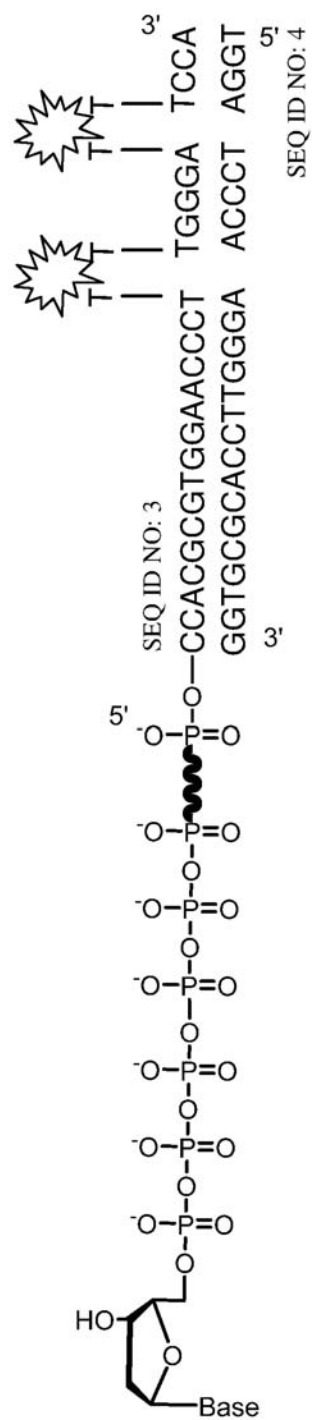


FIG. 3F

Métricas de alinhamento									
Comprimento de leitura			Precisão			Valor p			
354			86.4%			1e-65			
Inserções		Deleções		Incompatibilidades					
	#		#		A	C	G	T	total
A	2	A	6	A		0	0	5	5
C	8	C	9	C	0		0	0	0
G	0	G	4	G	2	0		1	3
T	2	T	8	T	2	0	1		3
total	12	total	27	total	4	0	1	6	11

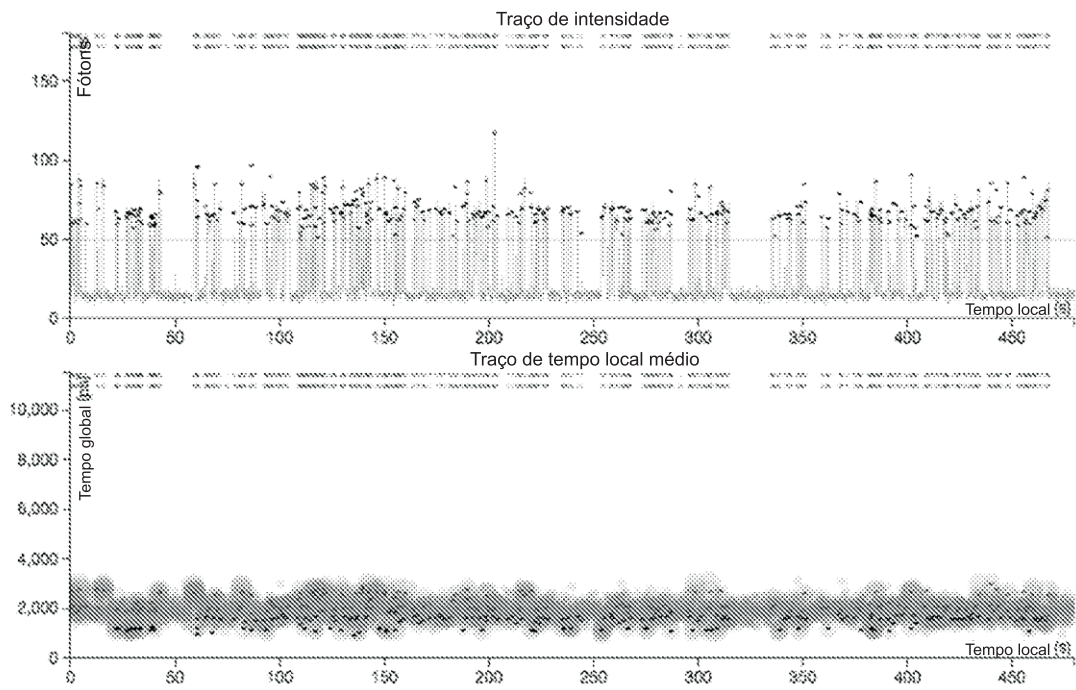


FIG. 3G

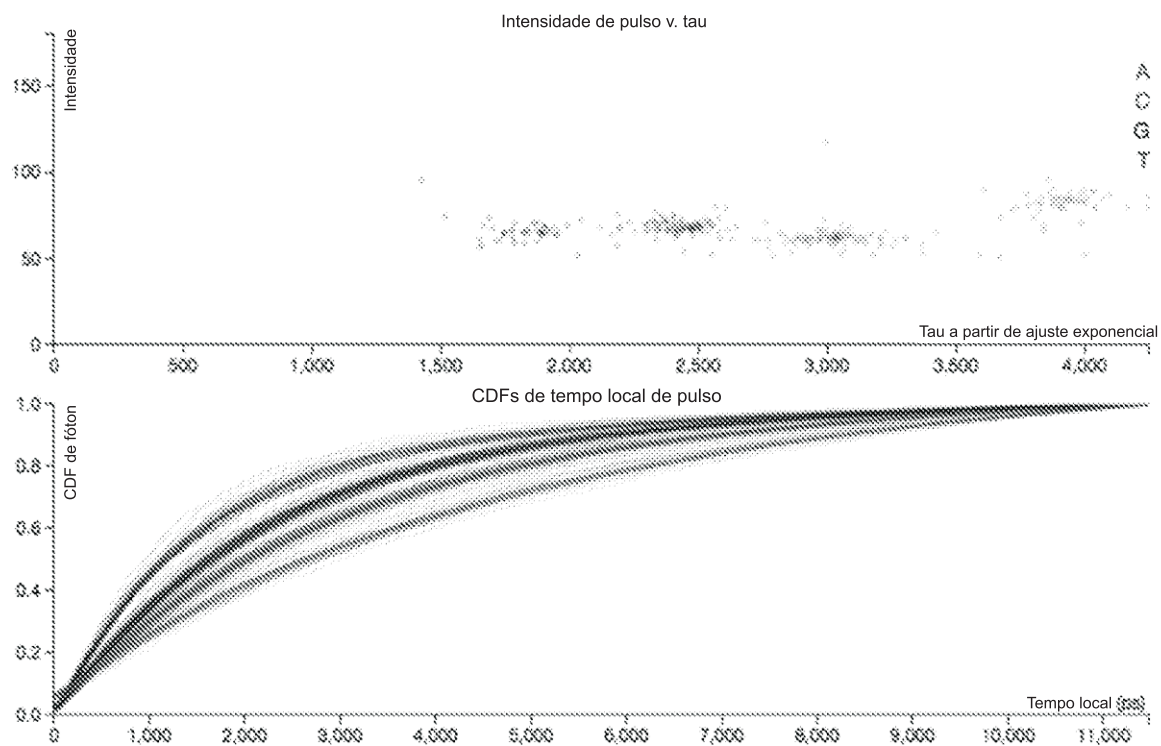


FIG. 3G (CONT.)

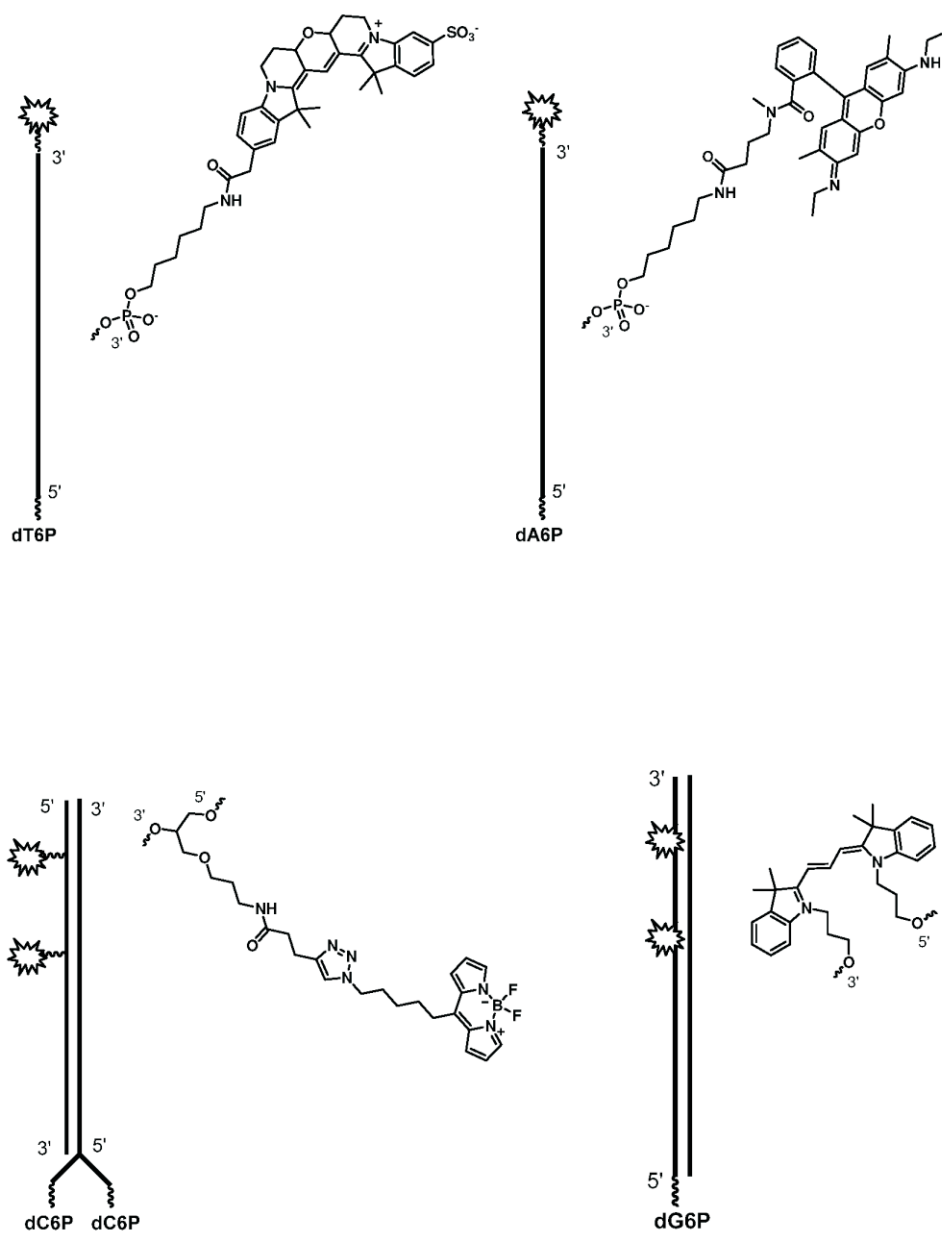


FIG. 3G (CONT.)

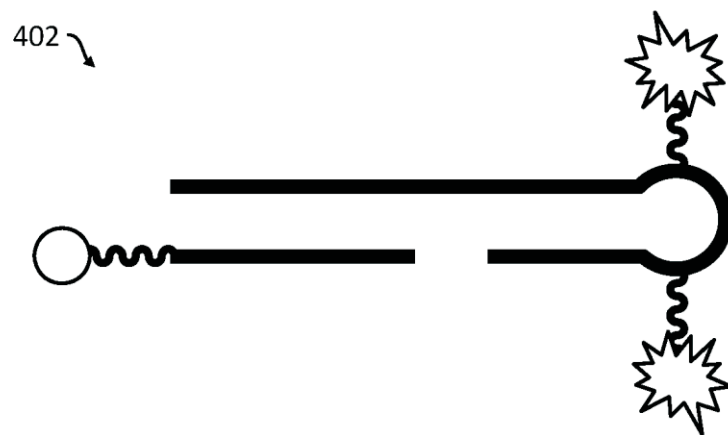
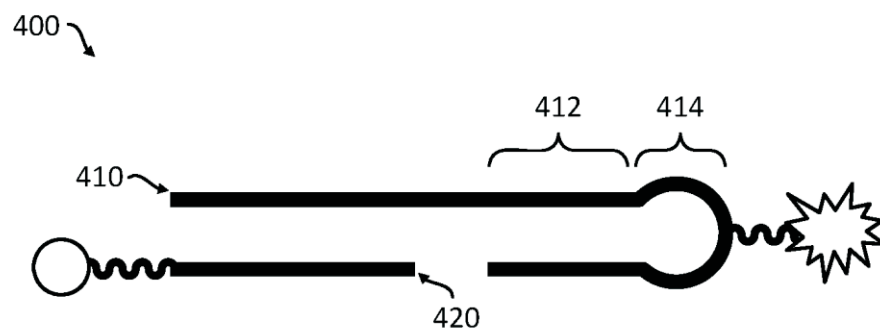


FIG. 4A

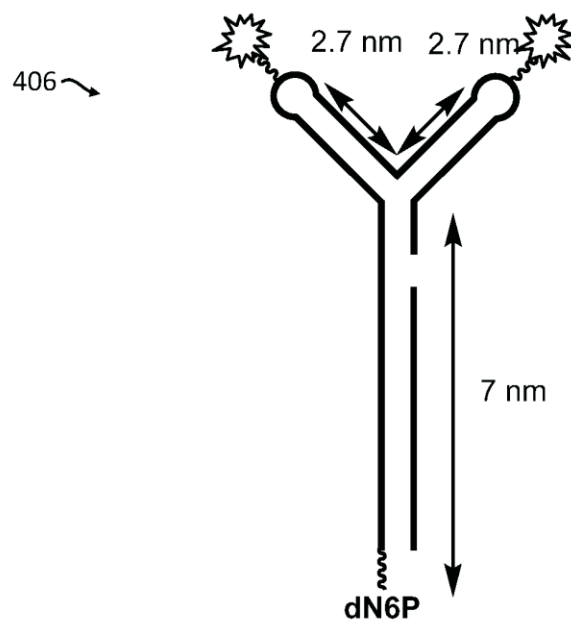
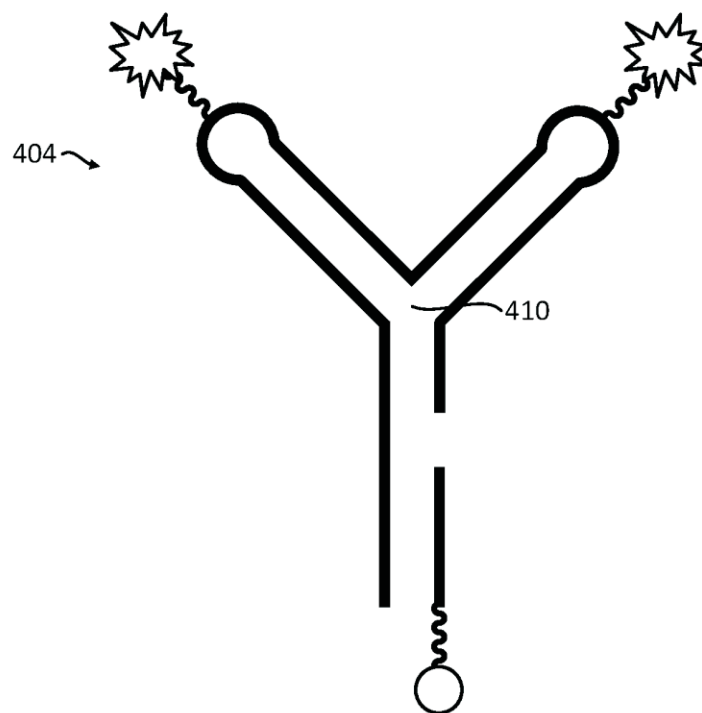


FIG. 4B

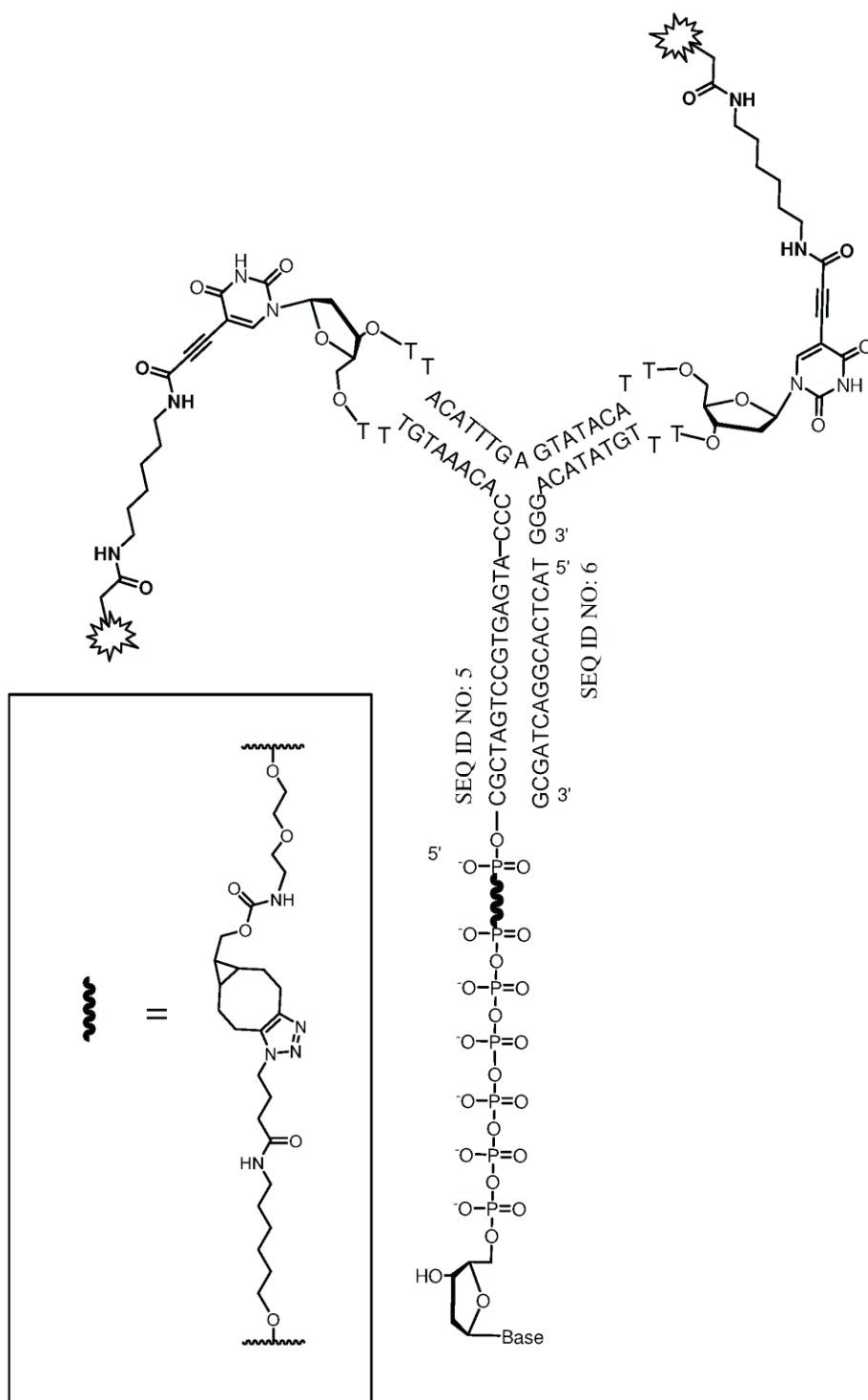


FIG. 4C

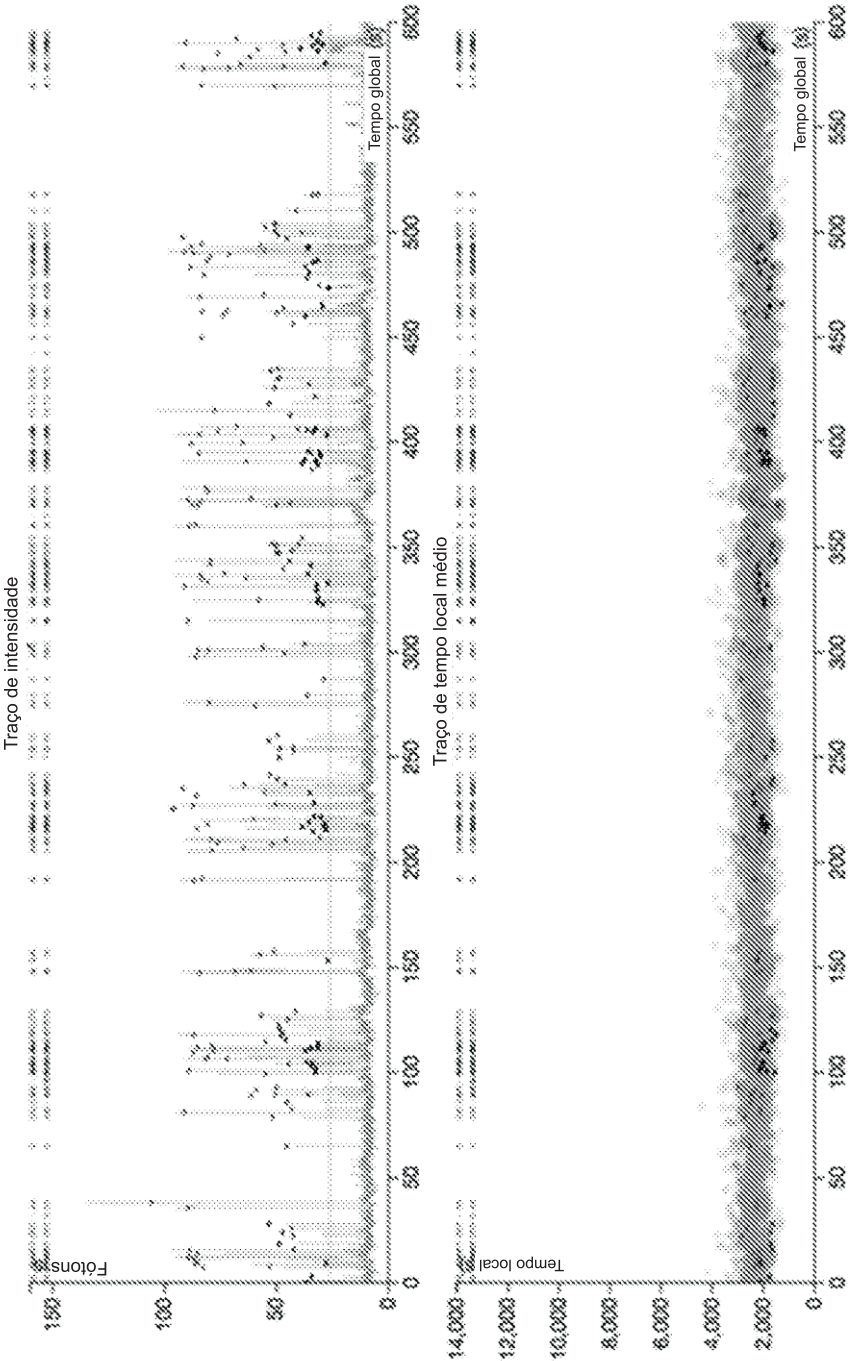


FIG. 4D

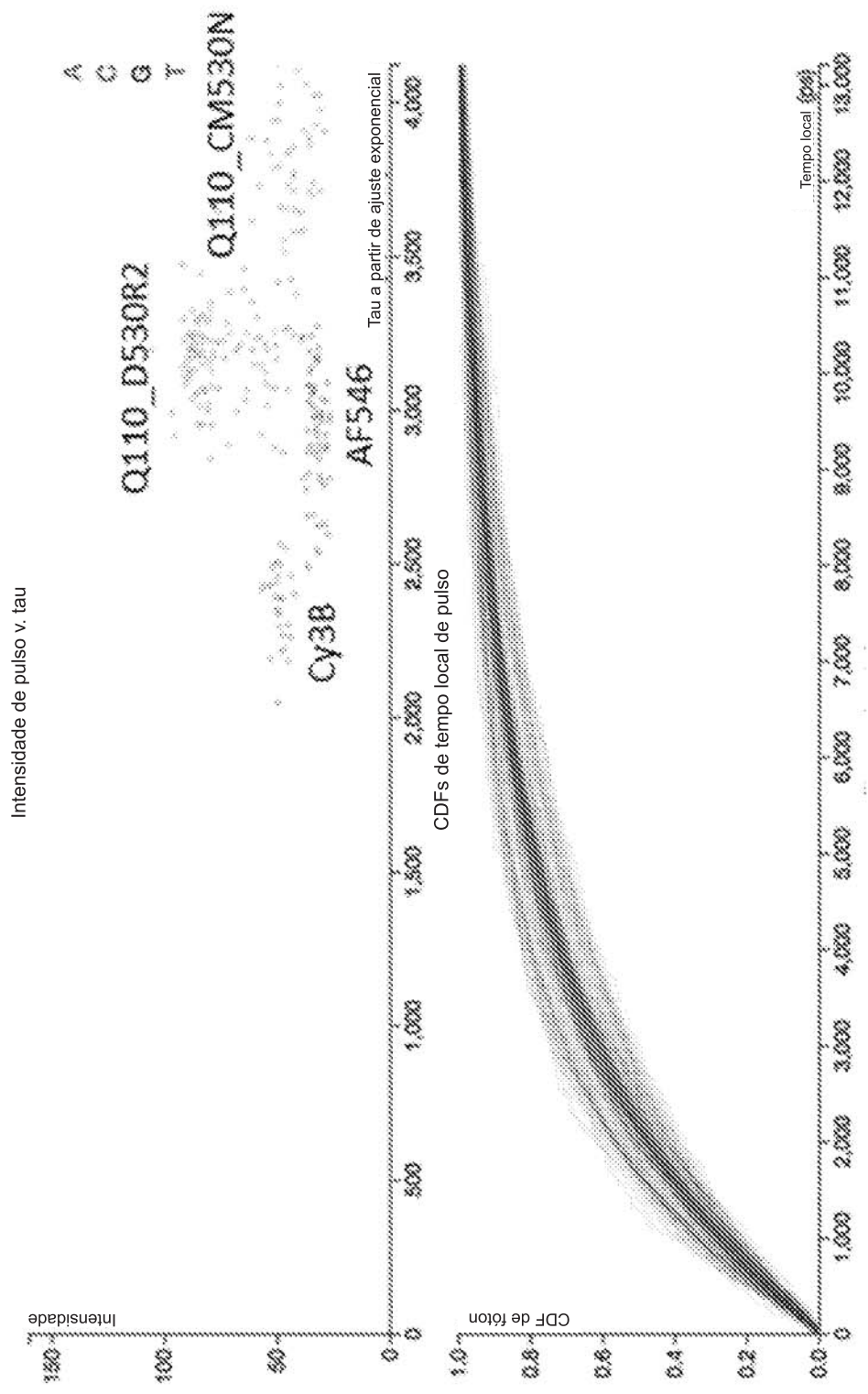


FIG. 4D (CONT)

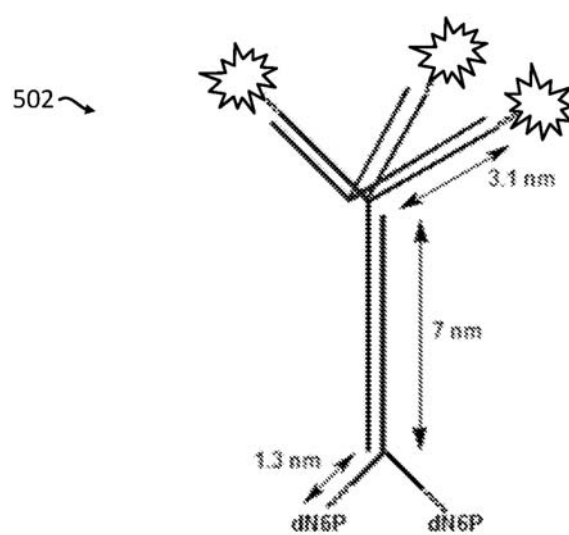
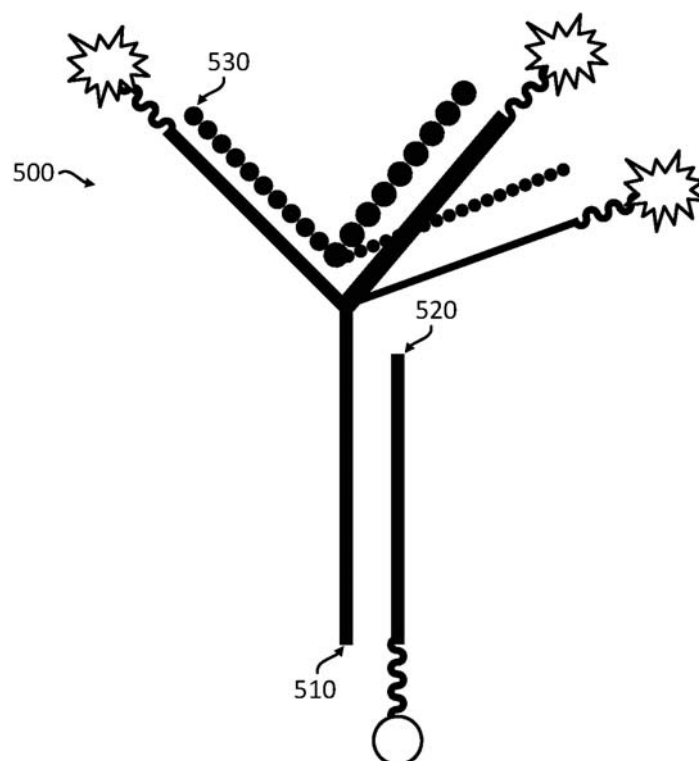


FIG. 5A

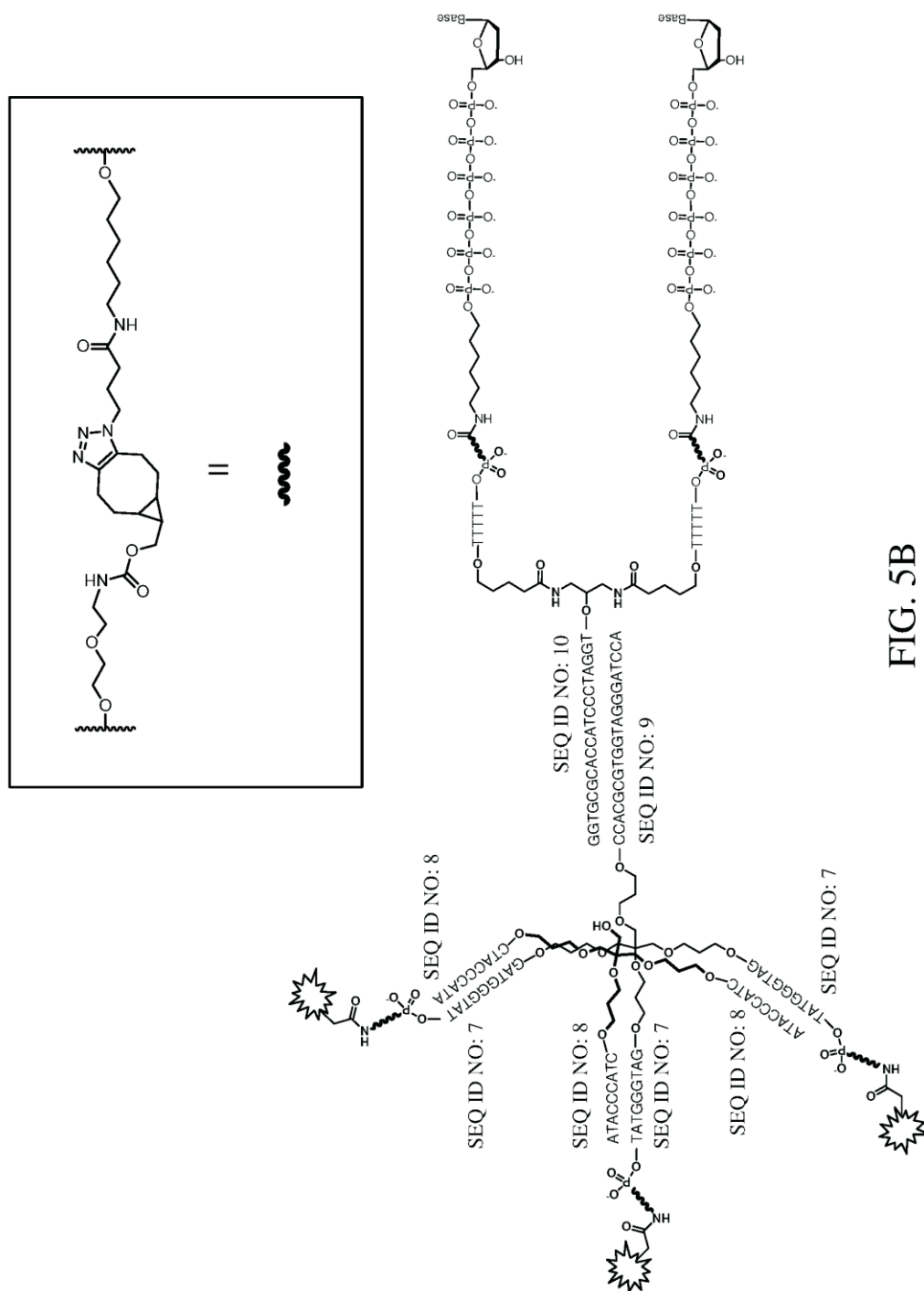


FIG. 5B

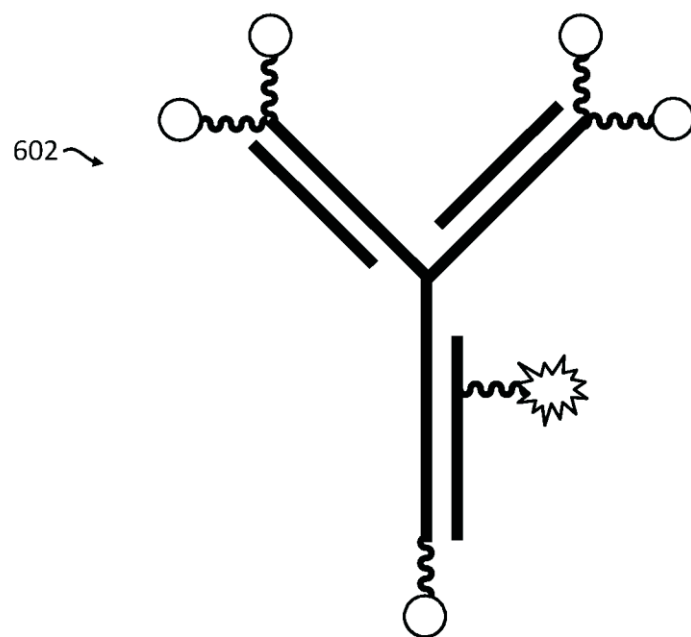
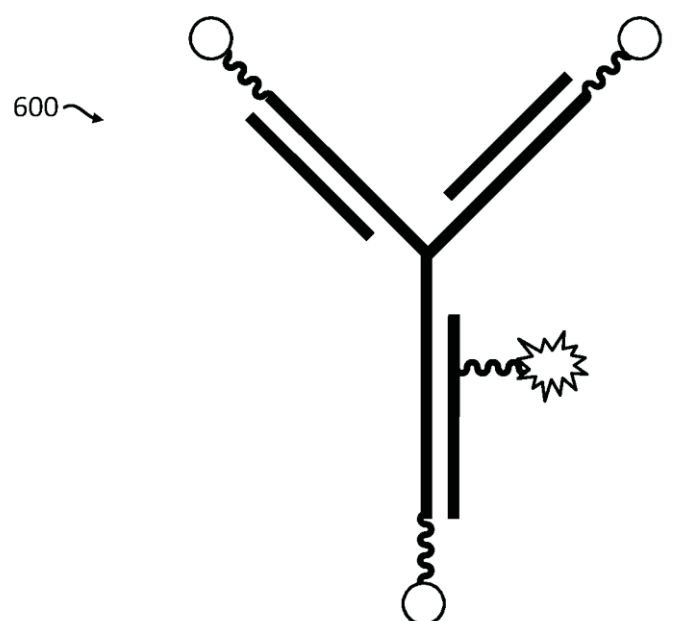


FIG. 6A

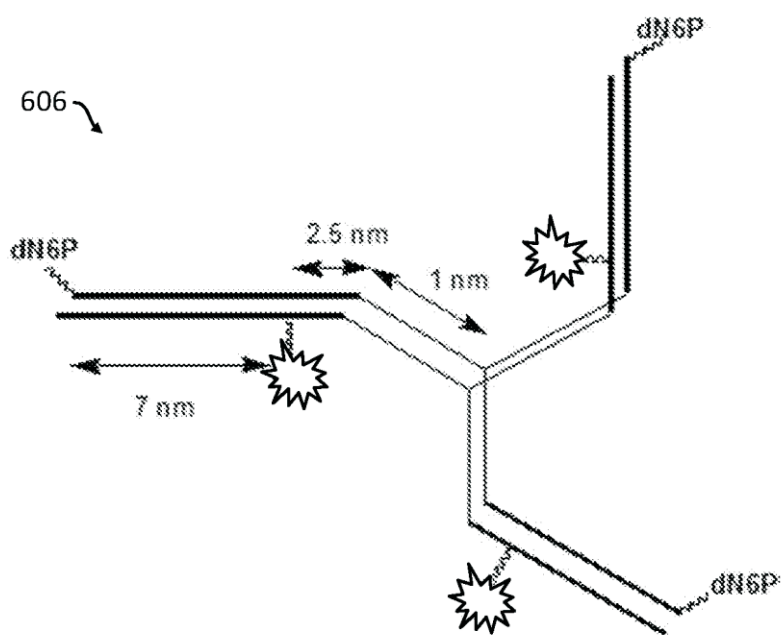
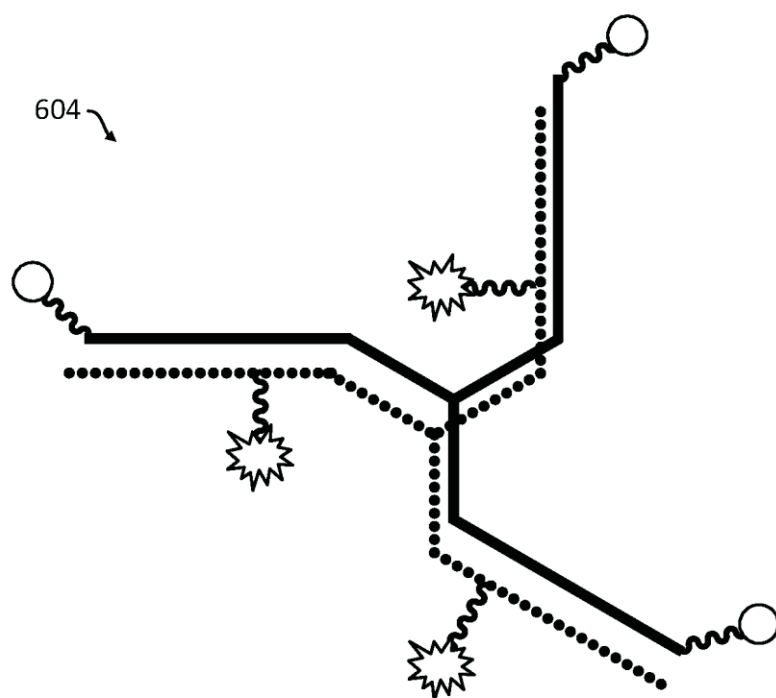


FIG. 6A (CONT)

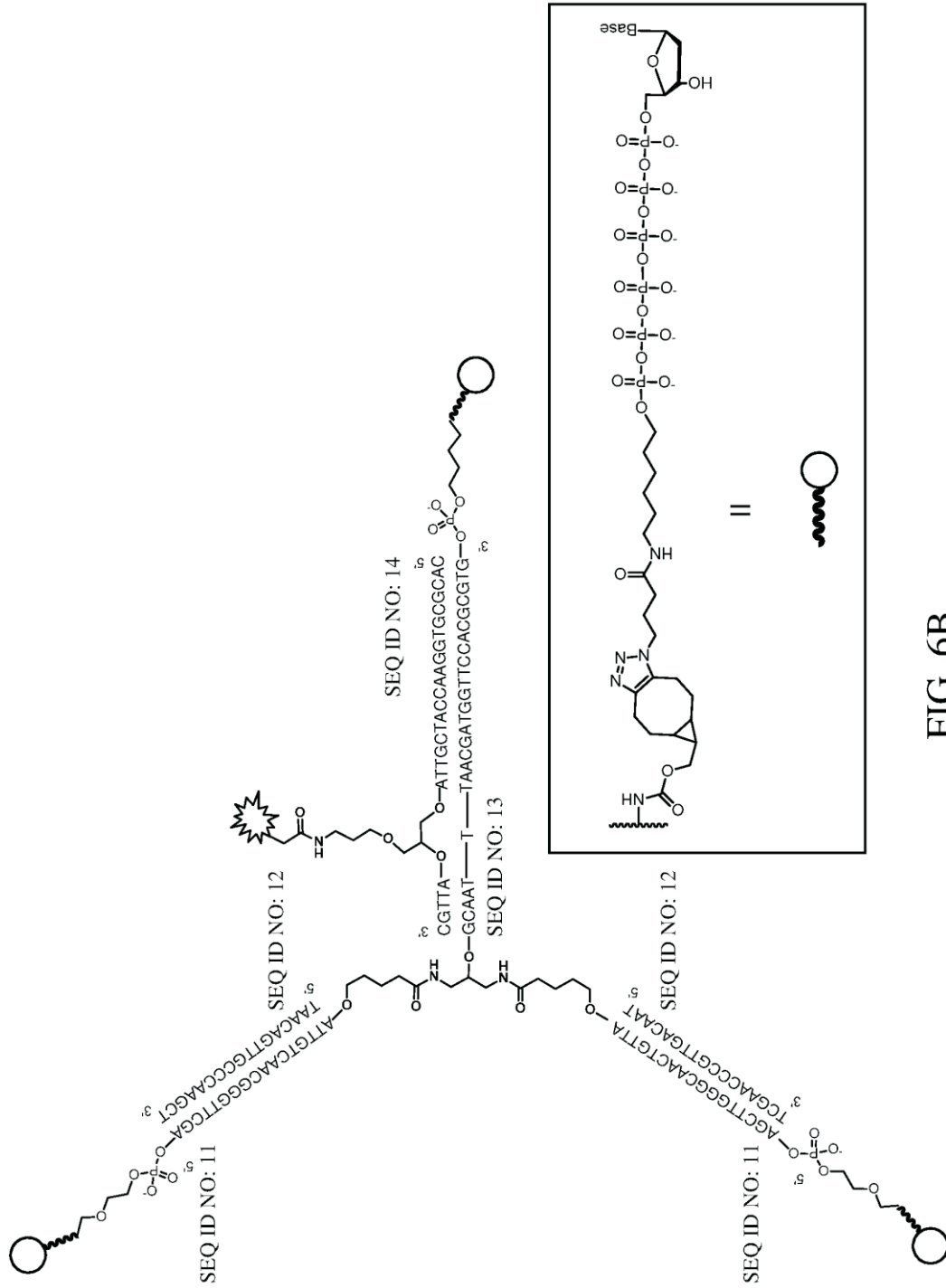


FIG. 6B

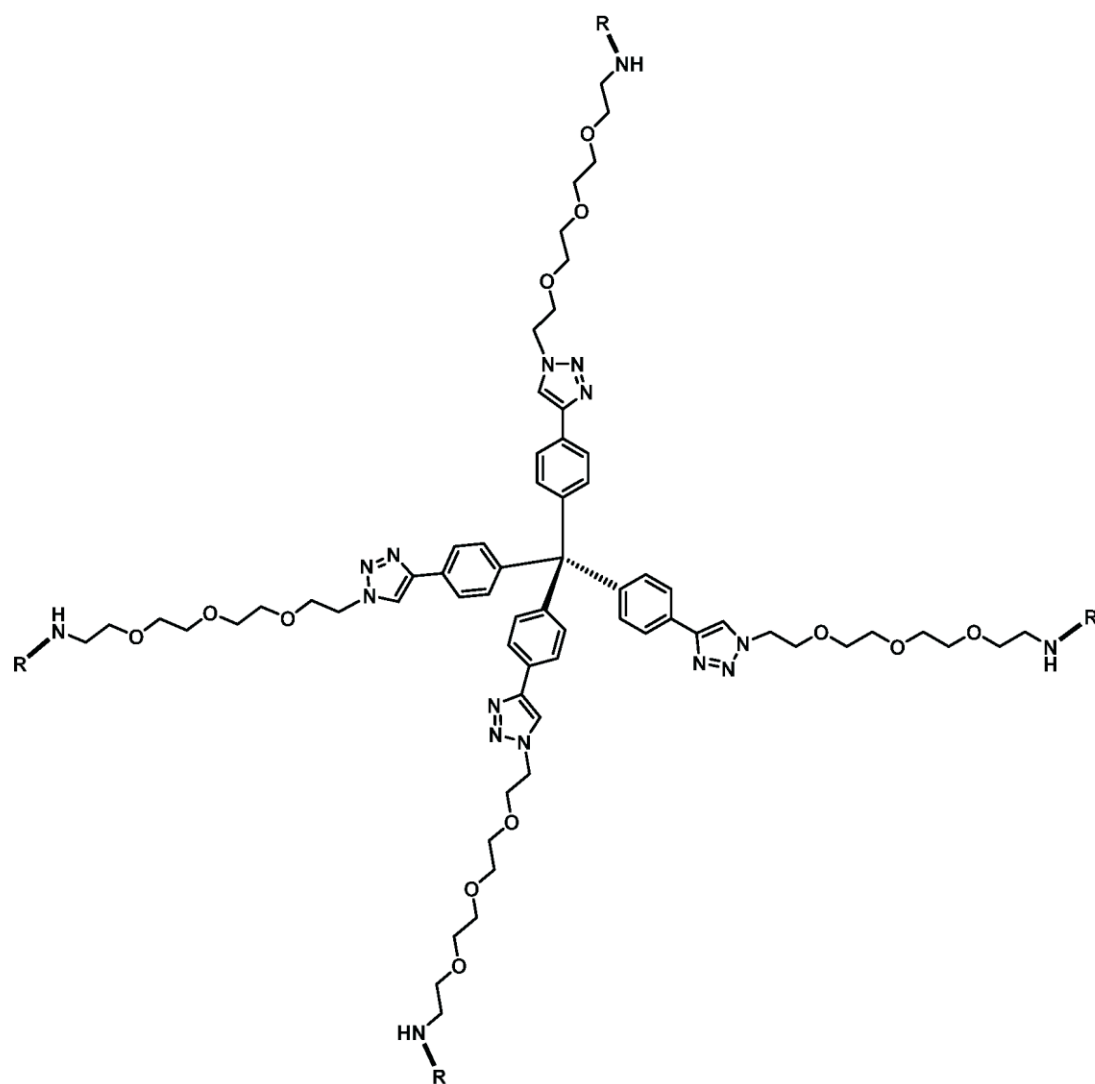


FIG. 6C

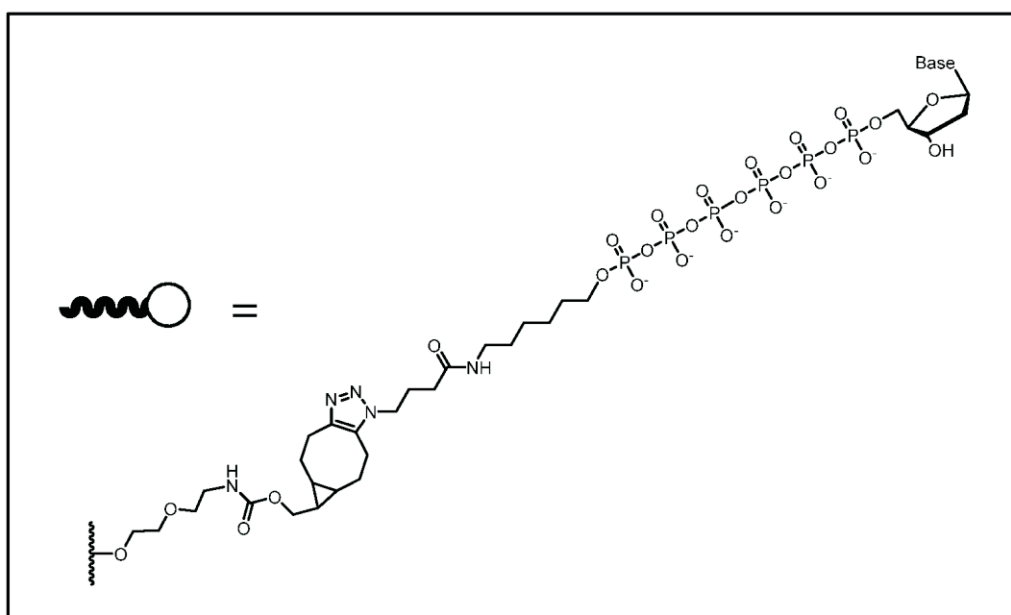
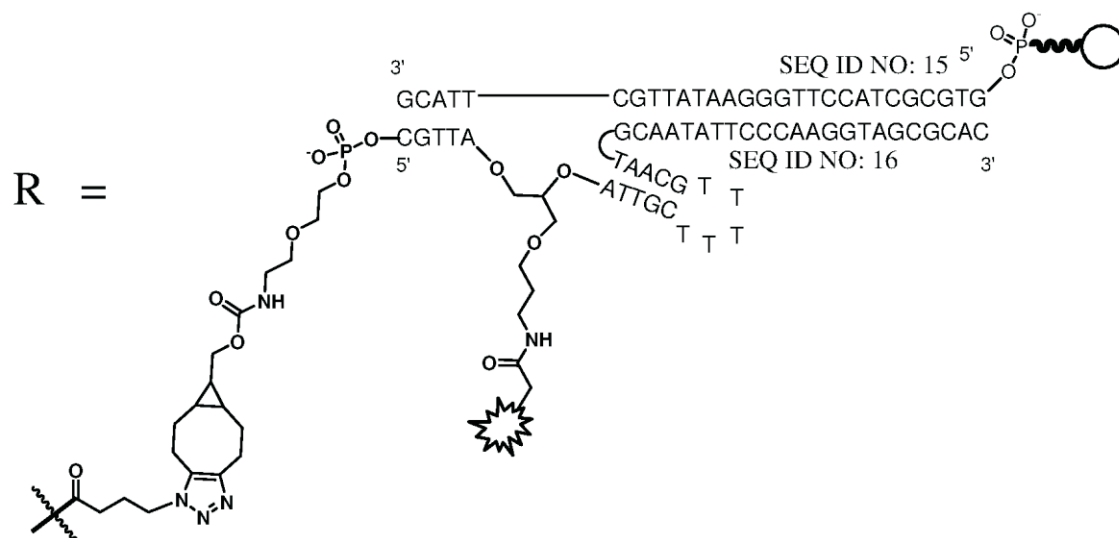


FIG. 6C (CONT.)

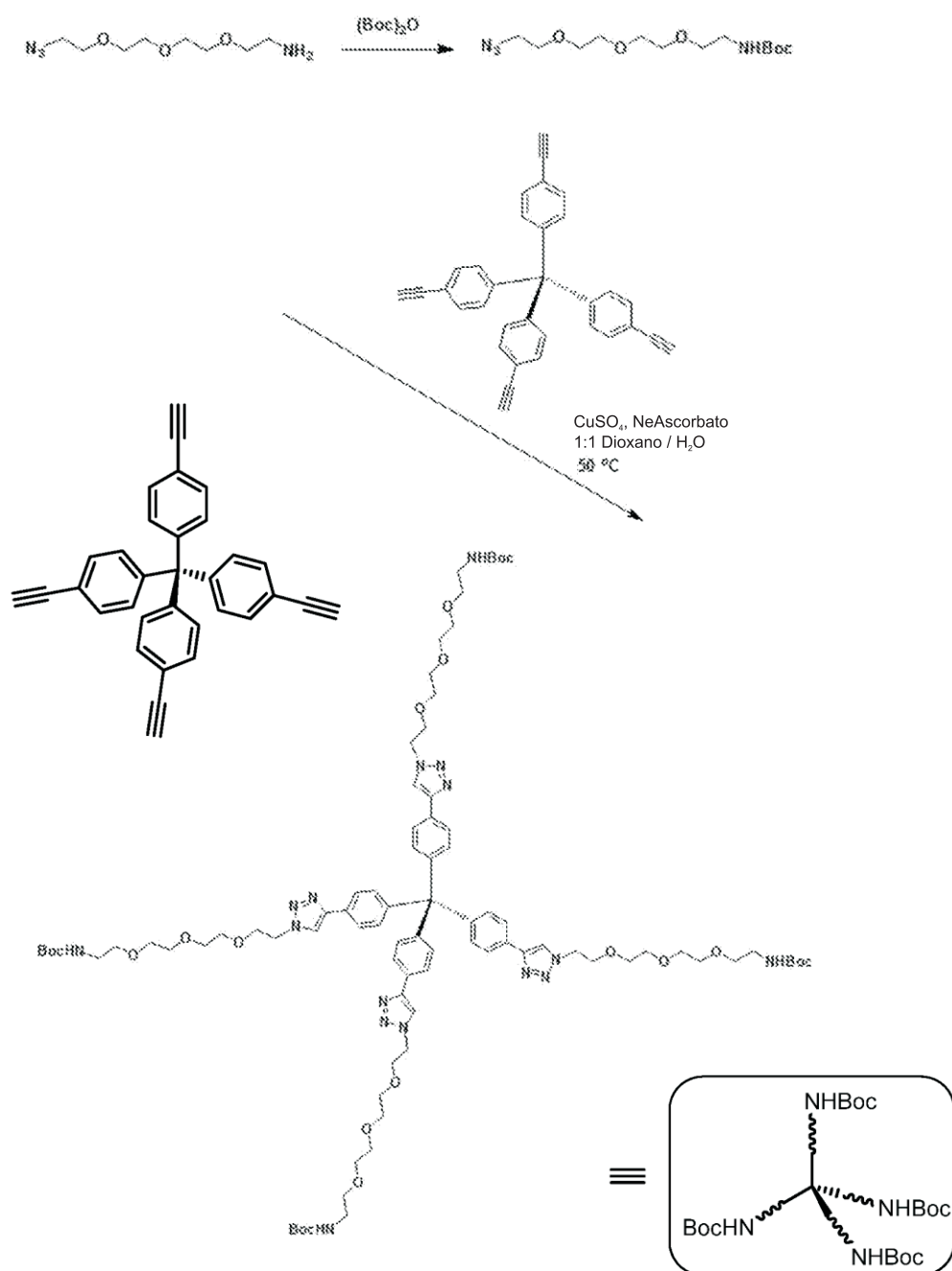


FIG. 6D

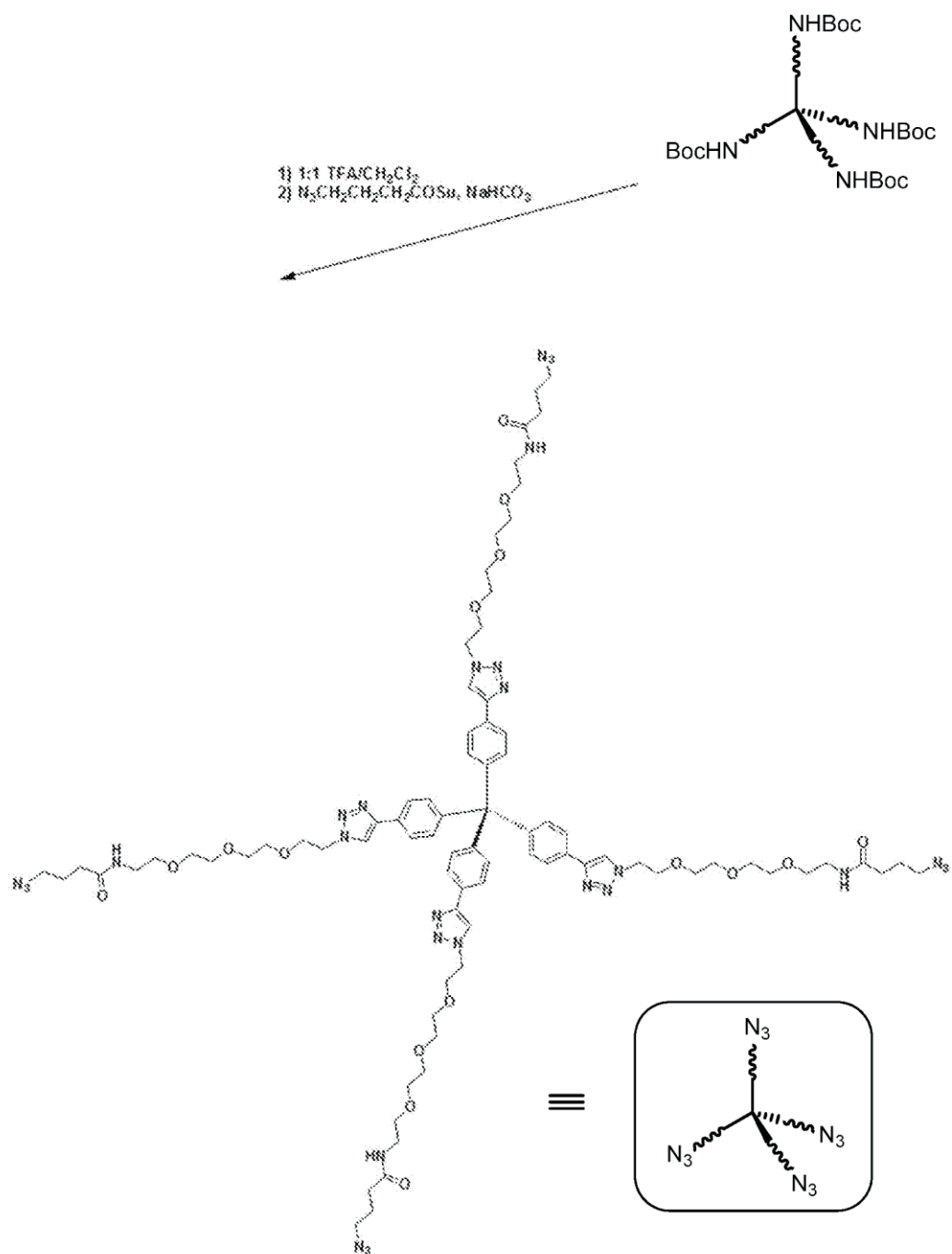


FIG. 6D (CONT.)

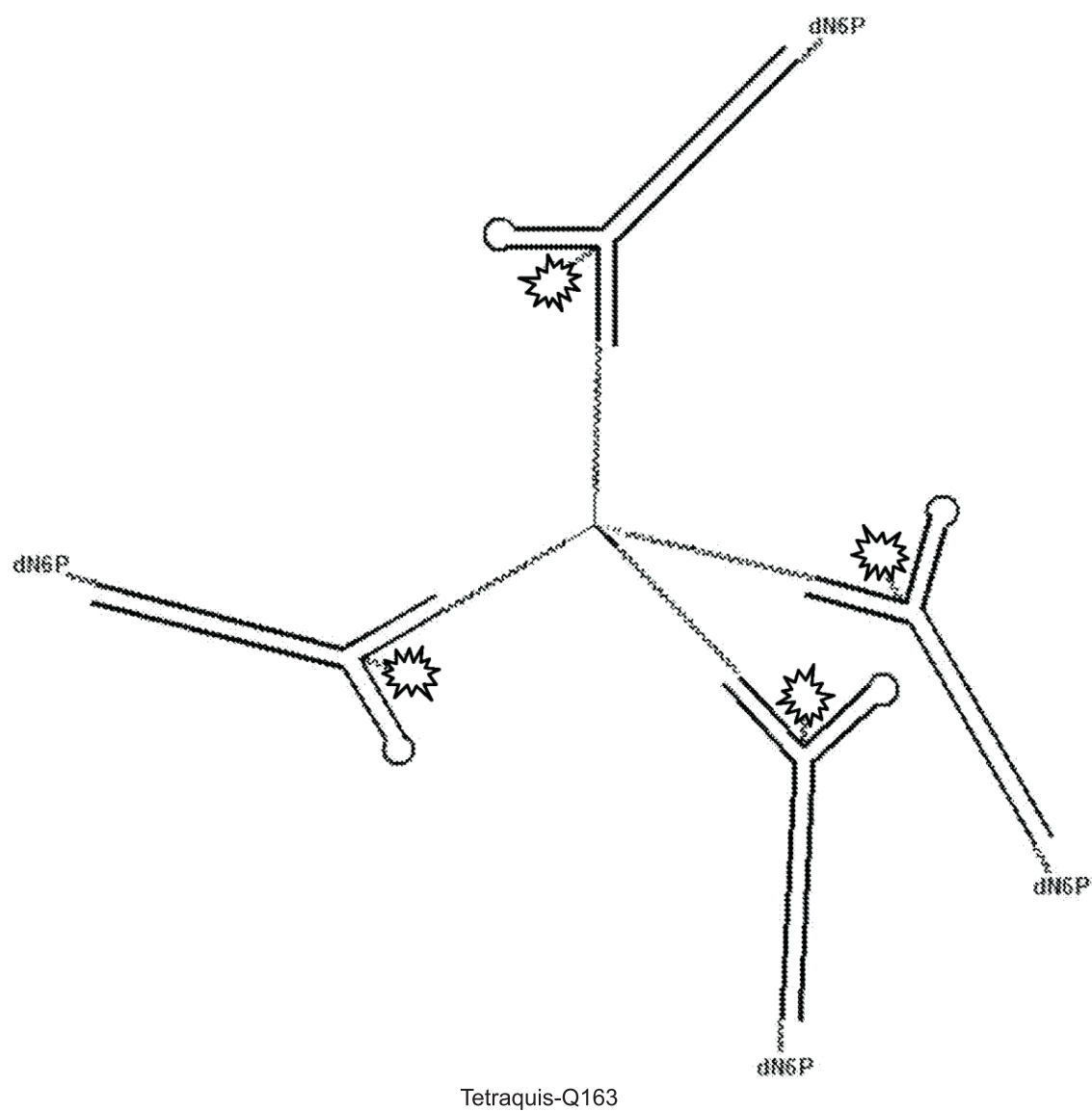


FIG. 6E

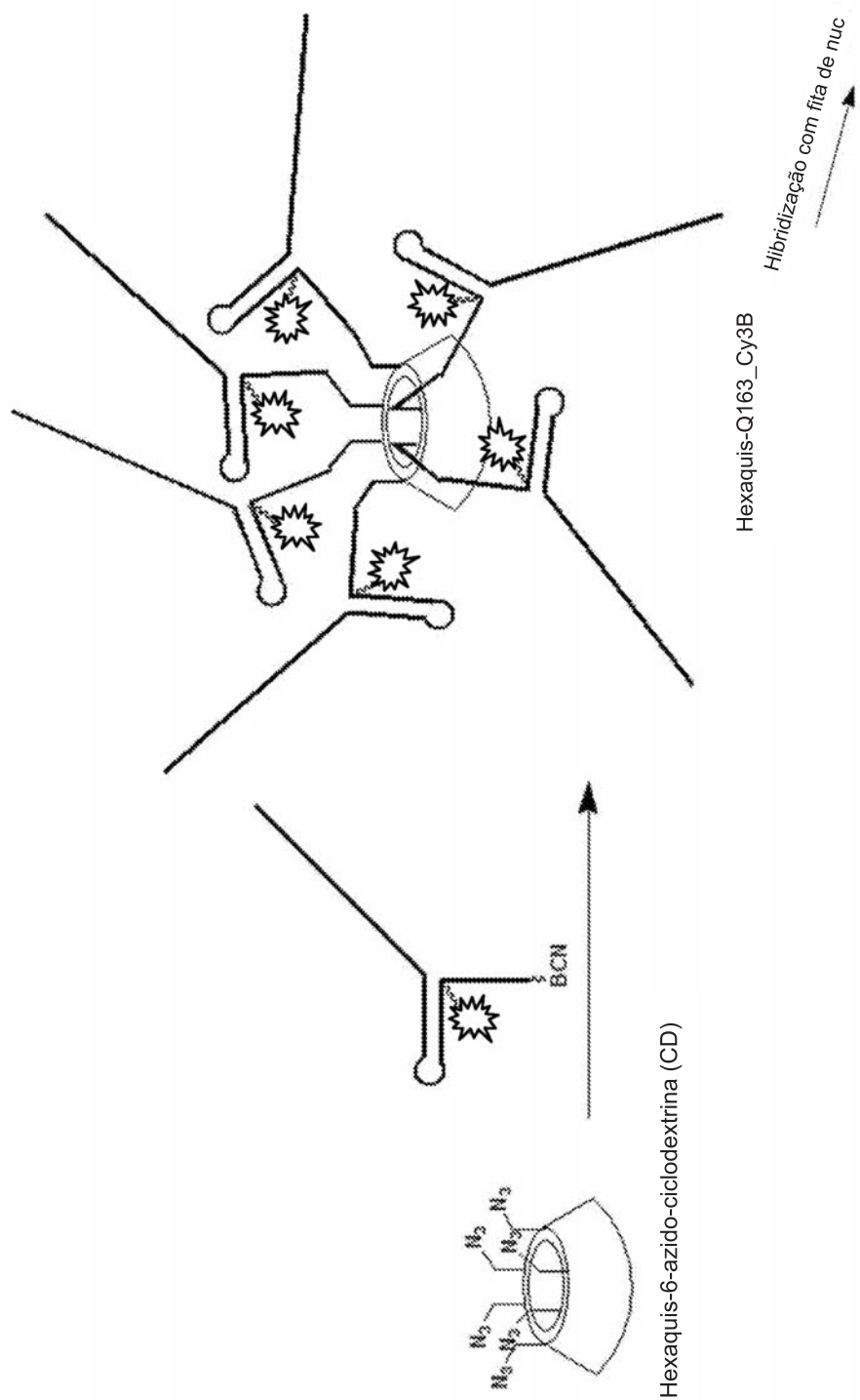


FIG. 7



FIG. 8

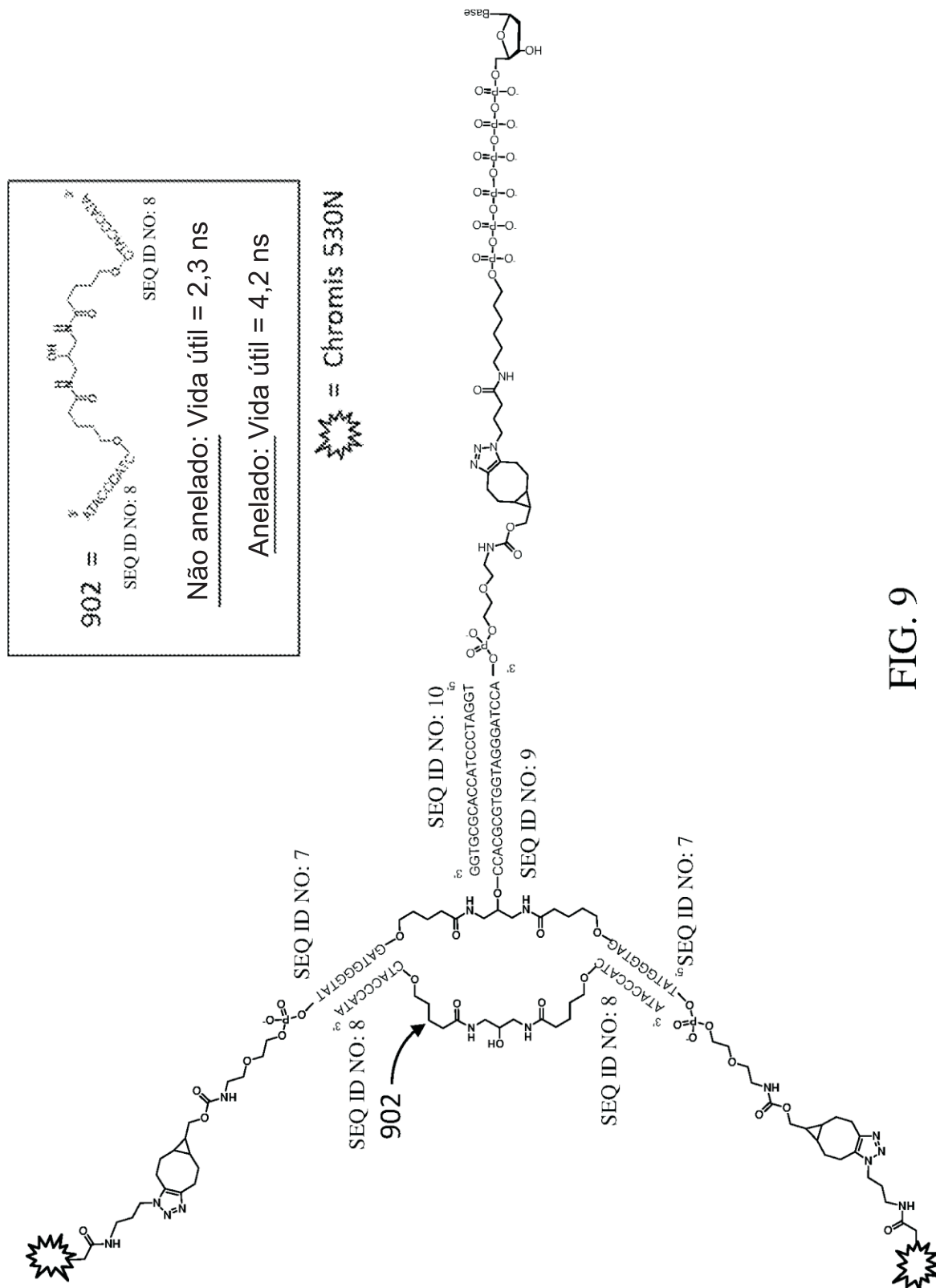


FIG. 9

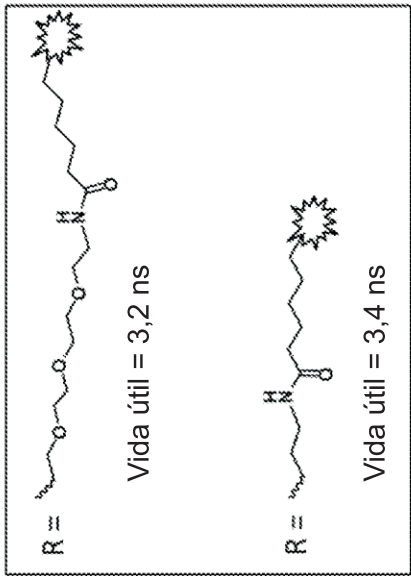


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES REAGENTES MARCADAS DE ALTA INTENSIDADE E MÉTODOS PARA SEQUENCIAMENTO"**.

A presente invenção refere-se a composições úteis para a detecção de moléculas únicas em uma amostra. Em alguns aspectos, a descrição fornece um ácido nucleico conectado a um nucleotídeo e dois ou mais marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos aqui descritos compreendem uma ou mais características estruturais que fornecem maior intensidade de fluorescência. Em alguns aspectos, são fornecidos métodos de sequenciamento usando os nucleotídeos marcados da descrição.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P244809.txt
- Data de Geração do Código: 13/01/2020
- Hora de Geração do Código: 11:16:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: 0833A5A02D0474F3
 - Campo 2: ED984C8087BE7945