

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 859**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6804 (2008.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2018 E 22174722 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 4112741**

54 Título: **Secuenciación por pasos mediante terminadores reversibles no marcados o nucleótidos naturales**

30 Prioridad:

04.01.2017 US 201762442263 P

26.04.2017 US 201762490511 P

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

12.06.2025

73 Titular/es:

MGI TECH CO., LTD. (50.00%)
11F-2, Complex Building of Bei Shan Industrial
Zone, No 146 Bei Shan Road Yantian District
Shenzhen, Guangdong 518083, CN y
BGI SHENZHEN (50.00%)

72 Inventor/es:

DRMANAC, RADOJE;
DRMANAC, SNEZANA;
LI, HANDONG;
XU, XUN;
CALLOW, MATTHEW J.;
ECKHARDT, LEON y
YANG, NAIBO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 026 859 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuenciación por pasos mediante terminadores reversibles no marcados o nucleótidos naturales

Antecedentes de la invención

La necesidad de métodos de bajo coste y alto rendimiento para la secuenciación y resecuenciación de ácidos nucleicos ha llevado al desarrollo de tecnologías de "secuenciación paralela masiva" (MPS). Un método comúnmente utilizado para secuenciar el ADN se denomina "secuenciación por síntesis" (SBS), tal como se describe en Ronaghi et al., Science, 281:363-365, 1998; Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 100:414-419, 2003; Metzker, Nat Rev Genet. 11:31-46, 2010; Ju et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 103:19635-19640, 2006; Bentley et al., Nature 456:53-59, 2008; y en la Patente de EE. UU. No. 6,210,891, 6,828,100, 6,833,246, y 6,911,345, y la Patente de EE. UU. Pub. N2016 / 0130647.

SBS requiere la incorporación controlada (es decir, uno a la vez) del nucleótido complementario correcto opuesto al oligonucleótido que se está secuenciando. Esto permite una secuenciación precisa mediante la adición de nucleótidos en múltiples ciclos, ya que cada residuo de nucleótido se secuencia de uno en uno, lo que evita que se produzca una serie incontrolada de incorporaciones. En un enfoque, se usan nucleótidos terminadores reversibles (RT) para determinar la secuencia de la plantilla de ADN. En el enfoque de SBS más utilizado, cada RT comprende un nucleótido modificado que incluye (1) un grupo de bloqueo que garantiza que una enzima de ADN polimerasa solo puede agregar una base al extremo 3' de una cadena de copia de ADN en crecimiento, y (2) un marcador fluorescente que puede ser detectada por una cámara. En los métodos SBS más comunes, se fijan las plantillas y los cebadores de secuenciación a un soporte sólido y se expone el soporte a cada uno de los cuatro análogos de nucleótidos de ADN, cada uno de los cuales comprende un fluoróforo diferente unido a la base nitrogenada mediante un enlazador escindible y un grupo 3'-O-azidometilo en la posición 3'-OH de la desoxirribosa y ADN polimerasa. Solo se hibrida la base complementaria correcta con el objetivo y posteriormente se incorpora en el terminal 3' del cebador. Los nucleótidos que no se han incorporado se eliminan por lavado y se obtienen imágenes del soporte sólido. Se introduce TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) para escindir el enlazador y liberar los fluoróforos y eliminar el grupo 3'-O-azidometilo, regenerando un 3'-OH. Entonces se puede repetir el ciclo (Bentley et al., Nature 456, 53-59, 2008). Se utiliza un marcador de color fluorescente diferente para cada una de las cuatro bases, de forma que se puede identificar en cada ciclo de secuenciación por su color la identidad del RT que se incorpora. El documento WO 2014/114665 A1 describe un método de secuenciación basado en ácidos nucleicos inmovilizado en una superficie que puede hacer uso de dNTP sin marcación. El documento WO 03/073088 A2 describe un aparato de detección que utiliza un transistor de efecto de campo sensible a iones para detectar eventos que ocurren durante una reacción química, lo que supuestamente permite monitorizar la inserción de dNTP sin marcación. Steemers et al, Nature Methods, vol. 3 n.º 1, enero de 2006, páginas 31-33, describe la inmovilización de fragmentos genómicos amplificados en una matriz, la hibridación de una sonda diseñada para hibridar adyacente a un sitio de consulta SNP en los fragmentos inmovilizados, la extensión de la sonda en presencia de didesoxinucleótidos marcados con hapteno y la detección de los didesoxinucleótidos marcados con hapteno incorporados utilizando un ensayo inmunohistoquímico tipo sándwich ortogonal, de múltiples capas y de dos colores.

A pesar del uso generalizado de SBS, aún se necesitan mejoras. Por ejemplo, los métodos SBS actuales requieren costosos dNTP (RT) terminados de forma reversible con un marcador (por ejemplo, tinte) en la base conectada con un enlazador escindible que da como resultado a) una cicatriz química que queda en las bases incorporadas después de la escisión del marcador, b) menos eficiente incorporación, c) atenuación, d) terminación de extensión inducida por tinte excitado y señal de reducción en cada ciclo de secuenciación.

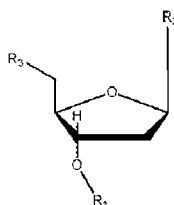
Breve resumen de la invención

La invención proporciona, según se define en la reivindicación 1, un método para identificar una nucleobase de un nucleótido 3' terminal de un producto de extensión de cebador. Se definen características adicionales en las reivindicaciones dependientes. La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para análisis y secuenciación de ácidos nucleicos. En el presente documento se describe un método de secuenciación SBS en el que se identifica la última base de nucleótidos incorporada mediante la unión de un reactivo de afinidad (por ejemplo, anticuerpo, aptámero, afímero, nudo, etc.) que reconoce la base basándose en la presencia de un grupo 3'-OH libre en el nucleótido 3' terminal o basándose en la presencia de un grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido 3' terminal. La unión está directa o indirectamente asociada con la producción de una señal detectable.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona métodos de secuenciación que emplean nucleótidos terminadores reversibles sin marcación (NLRT). Un nucleótido terminador reversible (RT) es un desoxinucleótido trifosfato modificado (dNTP) o un análogo de dNTP que contiene un grupo de bloqueo extraíble que garantiza que una enzima de ADN polimerasa solo pueda agregar una base única al extremo 3' de una cadena de copia de ADN en crecimiento. Como es bien sabido, la incorporación de un dNTP (2'-desoxinucleósido trifosfato) al extremo 3' de la cadena en crecimiento durante la síntesis de ADN implica la liberación de pirofosfato, y cuando se incorpora un dNTP a una cadena de ADN, la porción incorporada es un

monofosfato de nucleótido (o más precisamente, un monómero de nucleótido unido por enlaces fosfodiéster a uno o dos monómeros de nucleótido adyacentes). Un nucleótido terminador reversible (RT) es un desoxinucleótido trifosfato modificado (dNTP) o un análogo de dNTP que contiene un grupo de bloqueo extraíble que garantiza que una enzima de ADN polimerasa solo pueda agregar una base única al extremo 3' de una cadena de copia de ADN en crecimiento. Un nucleótido RT sin marcación no contiene un marcador detectable. En cada ciclo de secuenciación, se incorpora el nucleótido o análogo de nucleótido mediante una polimerasa, extendiendo el extremo 3' de la cadena de copia de ADN en una base, y se eliminan los nucleótidos o análogos de nucleótido no incorporados por lavado. Se introduce un reactivo de afinidad que reconoce específicamente y se une a uno o más epítopos de los nucleótidos o análogos de nucleótidos recién incorporados. Después de tomar una imagen, se eliminan el grupo de bloqueo y el reactivo de afinidad marcado del ADN, lo que permite que comience el siguiente ciclo de secuenciación. En algunas realizaciones, se forma el epítipo reconocido por el reactivo de afinidad por el propio nucleósido incorporado (es decir, la base más el azúcar) o el nucleósido y el grupo de bloqueo 3'. En algunas realizaciones, se forma el epítipo reconocido por el reactivo de afinidad por el propio terminador reversible, el terminador reversible en combinación con la desoxirribosa o el terminador reversible en combinación con la nucleobase o la nucleobase y la desoxirribosa.

De acuerdo con una de tales realizaciones, la presente invención proporciona métodos para secuenciar un ácido nucleico, que comprenden: (a) poner en contacto una plantilla de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico, un cebador de ácido nucleico complementario a una porción de dicha plantilla, una polimerasa y un RT no marcado de Fórmula I:



Fórmula I

en la que: R₁ es un grupo bloqueador reversible 3'-O; R₂ es una nucleobase seleccionada entre adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y análogos de las mismas; y R₃ comprende o consiste en uno o más fosfatos; bajo condiciones en las que el cebador se extiende para incorporar el RT no marcado en una secuencia complementaria a la plantilla de ácido nucleico, produciendo así un producto de extensión no marcado que comprende el RT incorporado; (b) poner en contacto el producto de extensión no marcado con un reactivo de afinidad bajo condiciones en las que el reactivo de afinidad se une específicamente al RT incorporado basándose en la presencia del grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido 3' terminal para producir un producto de extensión marcado que comprende el RT; (c) detectar la unión del reactivo de afinidad, y (d) identificar el nucleótido incorporado en el producto de extensión marcado para identificar al menos una porción de la secuencia de dicho producto de extensión, y por tanto del ácido nucleico plantilla.

En los análogos de dNTP comúnmente utilizados para la secuenciación por síntesis, se conjuga la nucleobase con un conector escindible que conecta la base con un marcador detectable, tal como un fluoróforo. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. Pub. 2002/0227131. Por el contrario, en los análogos de dNTP de la presente invención, generalmente R₂ no es una nucleobase conjugada con un tinte u otro marcador detectable por un enlazador.

De acuerdo con otra realización, dicho método comprende además (e) eliminar el grupo de bloqueo reversible del RT para producir un 3'-OH; y (f) retirar el reactivo de afinidad del RT.

De acuerdo con otra realización, dicho método comprende además repetir los pasos del método una o más veces, es decir, realizar múltiples ciclos de secuenciación, en el que se determina al menos una porción de la secuencia de dicha plantillade ácido nucleico.

De acuerdo con otra realización, dicho método comprende eliminar el grupo de bloqueo reversible y el reactivo de afinidad en la misma reacción.

De acuerdo con otra realización, tal método comprende eliminar los reactivos de afinidad sin eliminar los grupos de bloqueos reversibles y volver a sondear con reactivos de afinidad diferente.

En tales métodos, el reactivo de afinidad puede incluir anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos y similares), aptámeros, nudos, afimeros o cualquier otro agente conocido que se una a un NLRT incorporada con una especificidad y afinidad

adecuadas. En una realización, el reactivo de afinidad es un anticuerpo. En otra realización, el reactivo de afinidad es un anticuerpo que comprende un marcador detectable que es un marcador fluorescente.

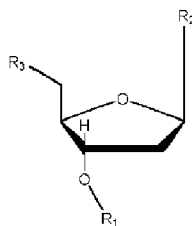
De acuerdo con una realización, R_1 se selecciona del grupo que consiste en alilo, azidometilo, aminoalcoxilo, 2-cianoetilo, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, alquenoilo sustituido, alquenoilo no sustituido, alquinilo sustituido, alquinilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, heteroalquenoilo sustituido, heteroalquenoilo no sustituido, heteroalquinilo sustituido, heteroalquinilo no sustituido, alenilo, cis-cianoetenilo, trans-cianoetenilo, cis-cianofluoroetenilo, trans-cianofluoroetenilo, cis-trifluorometiletenilo, trans-trifluorometiletenilo, biscianoetenilo, bisfluoroetenilo, cis-propenilo, trans-propenilo, nitroetenilo, acetoetenilo, metilcarbonoetenilo, amidoetenilo, metilsulfonoetenilo, metilsulfonoetilo, formimidato, formhidroximato, viniloetenilo, etilenoetenilo, cianoetenilo, nitroetenilo, amidoetenilo, amino, cianoetenilo, cianoetilo, alcoxi, acilo, metoximetilo, aminoxilo, carbonilo, nitrobencilo, cumarinilo y nitronaftalenilo.

De acuerdo con otra realización, R_2 es una nucleobase seleccionada de adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

De acuerdo con otra realización, R_3 consiste en o comprende uno o más fosfatos.

El término terminador reversible sin marcación (NLRT) puede referirse a la forma trifosfato del análogo de nucleótido, o puede referirse al NLRT incorporado.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan métodos para secuenciar un ácido nucleico, que comprenden: (a) proporcionar una matriz de ADN que comprende (i) una pluralidad de moléculas de ADN plantilla, comprendiendo cada molécula de ADN plantilla un fragmento del ácido nucleico, en el que cada una de dicha pluralidad de moléculas de ADN plantilla está unida en una posición de la matriz, (b) poner en contacto la matriz de ADN con un cebador de ácido nucleico complementario a una porción de cada una de dichas moléculas plantilla de ADN, una polimerasa y un RT sin marcación de Fórmula I:



Fórmula I

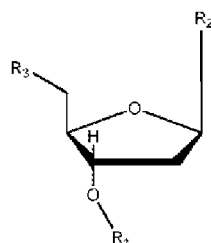
en la que: R_1 es un grupo bloqueador reversible en 3'-O; R_2 es una nucleobase seleccionada de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y análogos de las mismas; y R_3 consiste en o comprende uno o más fosfatos; bajo condiciones en las que se extiende el cebador para incorporar el RT sin marcación en una secuencia complementaria a al menos algunas de dicha pluralidad de dichas moléculas de ADN plantilla, produciendo así productos de extensión sin marcación que comprenden el RT; (c) poner en contacto los productos de extensión sin marcación con un reactivo de afinidad que comprende un marcador detectable bajo condiciones en las que se une el reactivo de afinidad específicamente al RT basado en la presencia del grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido terminal 3' para producir productos de extensión marcados que comprenden el RT; y (d) identificar el RT en los productos de extensión marcados para identificar al menos una porción de la secuencia de dicho ácido nucleico.

De acuerdo con una realización de la invención, tal método comprende: (b) poner en contacto la matriz de ADN con un cebador de ácido nucleico complementario a una porción de cada una de dichas moléculas de ADN plantilla, una polimerasa y un conjunto de RT no marcadas de Fórmula I que comprende un primer RT en el que R_2 es A, un segundo RT en el que R_2 es T, un tercer RT en el que R_2 es C, y un cuarto RT en el que R_2 es G, bajo condiciones en las que el cebador se extiende para incorporar los RT sin marcación en secuencias complementarias a al menos algunas de dicha pluralidad de dichas moléculas de ADN plantilla, produciendo así productos de extensión sin marcación que comprenden los RT; (c) poner en contacto los productos de extensión sin marcación con un conjunto de reactivos de afinidad bajo condiciones en las que el conjunto de reactivos de afinidad se une específicamente a los RT incorporados basados en la presencia del grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido terminal 3' para producir productos de extensión marcados que comprenden los RT, en los que: (i) el conjunto de reactivos de afinidad comprende un primer reactivo de afinidad que se une específicamente al primer RT, un segundo reactivo de afinidad que se une específicamente al segundo RT, un tercer reactivo de afinidad que se une específicamente al tercer RT y, opcionalmente, un cuarto reactivo de afinidad que se une específicamente al cuarto RT; (ii) cada uno de dichos reactivos de afinidad primero, segundo y tercero comprende un marcador detectable; y (d) identificar los RT en los productos de extensión marcados mediante la identificación del marcador del reactivo de afinidad unido a los RT en sus respectivas posiciones en la matriz para identificar al menos una porción (por ejemplo, una base por ciclo) de la secuencia

de dicho ácido nucleico. De acuerdo con una realización relacionada, cada uno de dichos reactivos de afinidad primero, segundo, tercero y cuarto comprende un marcador detectable. De acuerdo con otra realización relacionada, cada uno de dichos reactivos de afinidad primero, segundo y tercero comprende un marcador detectable diferente. De acuerdo con otra realización relacionada, cada uno de los reactivos de afinidad primero, segundo y tercero comprende el mismo marcador (por ejemplo, el mismo fluoróforo(s)) en diferentes cantidades, lo que da como resultado señales de diferentes intensidades. De acuerdo con otra realización, los reactivos de afinidad unidos a los RT incorporados no se marcan directamente, sino que se marcan indirectamente utilizando reactivos de afinidad secundarios.

Se describen matrices de ADN. Dichas matrices comprenden: una pluralidad de moléculas de ADN plantilla, cada molécula de ADN unida en una posición de la matriz, una secuencia de ADN complementaria apareada con una porción de la molécula de ADN plantilla en una pluralidad de posiciones, en la que la secuencia de ADN complementaria comprende en su extremo 3' un RT incorporado; y un reactivo de afinidad unido específicamente a al menos algunos de los RT, comprendiendo el reactivo de afinidad un marcador detectable que identifica el RT al que está unido.

Se describen kits que comprenden: (a) un RT sin marcar de Fórmula I:



Fórmula I

en la que: R_1 es un grupo bloqueador reversible 3'-O; R_2 es una nucleobase seleccionada entre adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y análogos de las mismas; y R_3 consiste en o comprende uno o más fosfatos; (b) un reactivo de afinidad marcado que se une específicamente a uno de los RT; y (c) un empaquetamiento para el RT y el reactivo de afinidad. De acuerdo con otra realización, tal kit comprende: una pluralidad de los RT, donde cada RT comprende una nucleobase diferente, y una pluralidad de reactivos de afinidad, donde cada reactivo de afinidad se une específicamente a uno de los RT.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de un método de secuenciación de la invención.

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de un proceso de tinción de anticuerpos que se muestra en la Figura 1.

La Figura 3 muestra ejemplos de estructuras NLRT: Fig. 3A 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina; Fig. 3B 3'-O-amino-2'-desoxiguanina; Fig. 3C 3'-O-cianoetileno-2'-desoxiguanina; Fig. 3D 3'-O-fosfo; Figura 3E: 3'-etildisulfuro-metileno-2'-desoxitimina.

La Figura 4 ilustra diversos grupos de bloqueo que pueden usarse en la práctica de la invención. En la Figura 4, "~~~~" indica el punto de unión de la molécula al resto de la estructura.

La Figura 5 ilustra la síntesis del éster activo de 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina (G4).

La Figura 6 ilustra la síntesis del éster activo de 3'-O-azidometil-2'- (C8)

La Figura 7 ilustra la síntesis del éster activo de 3'-O-azidometil-2'-desoxiadenina (A12).

La Figura 8 ilustra la síntesis del éster activo de 3'-O-azidometil-2'-desoxitimina (T16).

La Figura 9 ilustra (utilizando 3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina) la conjugación de éster 3'-O-azidometil-dC-NHS con BSA, KHL y resina de agarosa para su uso como inmunógeno, monitor de título y sustrato para la purificación por afinidad. Las Figuras 10A y 10B muestran Rho para 5 y 10 ciclos de secuenciación utilizando tres RT marcados y un NLRT.

Las Figuras 10C y 10D muestran las relaciones señal-ruido (SNR) para 5 y 10 ciclos de secuenciación usando tres RT marcados y un NLRT.

Las Figuras 11A y 11B ilustran las métricas de datos de secuenciación obtenidas con el secuenciador de ADN BGISEQ-1000 con 3'-azidometil-dGTP sin marcación detectado por anticuerpo primario de conejo anti-3'-azidometil-dG y anticuerpo secundario de fragmento AF647 anti-conejo durante 50 ciclos de secuenciación por síntesis.

- 5 Las Figuras 12A y 12B ilustran los resultados de 25 ciclos de secuenciación de *E. coli* ADN genómico en un instrumento BGISEQ-500 usando anticuerpos anti-azidometil-base marcados directamente con fluorescencia.

Descripción detallada de la invención

1. Visión general

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos y composiciones para secuenciación por síntesis (SBS) o secuenciación de anclaje de sonda combinatoria (cPAS) de ácidos nucleicos que emplean nucleótidos terminadores reversibles sin marcación. En un enfoque, la SBS se lleva a cabo mediante la producción de ADN plantilla monocatenario inmovilizados en posiciones de una matriz. En la mayoría de los enfoques, cada plantilla de ADN monocatenario inmovilizado se encuentra en una posición con un gran número de copias (por ejemplo, amplicones) de una secuencia similar. Por ejemplo, la PCR puente se puede usar para generar un grupo de secuencias plantilla en una posición en una matriz (Illumina), o se puede usar la replicación en círculo rodante para generar un concatémero monocatenario, o nanobola de ADN (DNB), con muchas copias de las secuencias plantilla (Complete Genomics, Inc.). La SBS se lleva a cabo hibridando un cebador o cebadores con el ADN plantilla y extendiendo el cebador para producir un cebador extendido o una cadena de ADN en crecimiento (GDS). La extensión del cebador se refiere a la adición ("incorporación" o "incorporando") de nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de ADN del cebador mientras se hibrida con la plantilla. El nucleótido incorporado en el extremo 3' es complementario al nucleótido correspondiente del cebador de modo que determinando la identidad del nucleótido incorporado en cada ciclo de secuenciación se puede determinar la secuencia de nucleótidos del plantilla.

En un enfoque de la técnica anterior, los análogos de nucleótidos marcados se incorporan a la GDS. En general, los análogos de nucleótidos marcados comprenden un grupo de bloqueo que asegura que solo se puede incorporar un único nucleótido por paso y un tinte (típicamente un tinte fluorescente) unido al nucleótido a través de un conector escindible. Cada ciclo de secuenciación comprende la incorporación de un análogo de nucleótido marcado al final de la GDS, la detección del marcador del análogo de nucleótido marcado incorporado, la eliminación del marcador del análogo de nucleótido incorporado y la eliminación del grupo de bloqueo del análogo de nucleótido incorporado para permitir la incorporación de un nuevo análogo de nucleótido marcado. Por el contrario, la presente invención no requiere análogos de nucleótidos marcados que incluyan un tinte unido mediante un conector escindible a una base o azúcar.

En un enfoque alternativo descrito en la Publicación de Pat. de EE. UU. El documento US2017/0240961, un análogo de nucleótido, cuando se incorpora, comprende un marcador de afinidad unida a través de un conector al nucleótido. El marcador de afinidad es un miembro de un par de enlace específico (SBP). En un enfoque, el marcador de afinidad es biotina. Después de la incorporación, el nucleótido incorporado se expone a un reactivo de afinidad que comprende el segundo miembro del SBP (por ejemplo, estreptavidina) y un marcador detectable. El marcador detectable se detecta para identificar el nucleótido incorporado. Después de la detección, se trata el complejo de reactivo de afinidad de análogo de nucleótido incorporado para escindir el enlazador y liberar el marcador detectable. En un enfoque, el marcador de afinidad es un antígeno y el reactivo de afinidad es un anticuerpo marcado con fluorescencia que se une específicamente al antígeno. Por el contrario, la presente invención no requiere un marcador de afinidad y emplea, en algunos aspectos, un reactivo de afinidad que se une a la nucleobase, el resto de azúcar, el grupo de bloqueo escindible o una combinación de los mismos, en lugar de un marcador de afinidad.

De acuerdo con un aspecto del método descrito en el presente documento, se incorpora un terminador reversible sin marcación, es decir, un análogo de nucleótido que incluye un terminador reversible o un grupo bloqueador ((terminador reversible sin marcación, o NLRT), en el extremo 3' del GDS y luego se expone a un reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente al NLRT incorporado (el "evento de unión"). Después de la detección del evento de unión, se elimina el reactivo de afinidad. En un enfoque, se incorpora un análogo de nucleótido que comprende un grupo de bloqueo reversible en el extremo 3' del GDS y, después de la detección del evento de unión, se eliminan el grupo de bloqueo reversible y el reactivo de afinidad, opcionalmente en el mismo paso. En este enfoque, cada ciclo de secuenciación incluye: (i) incorporación de un NLRT que comprende un grupo de bloqueo por una ADN polimerasa, seguido de eliminación por lavado de los NLRT no incorporados; (ii) poner en contacto el análogo de nucleótido incorporado con un reactivo de afinidad marcado que reconoce y se une específicamente a la NLRT incorporada; (iii) detectar la unión del reactivo de afinidad; (iv) eliminar el grupo de bloqueo de una manera que permita la incorporación de un análogo de nucleótido adicional (por ejemplo, produce un grupo hidroxilo en la posición 3' de un resto de desoxirribosa), y (v) eliminar el reactivo de afinidad. Este paso puede ir seguido de un nuevo ciclo o ciclos en los que se incorpora y detecta un nuevo análogo de nucleótido. El reactivo de afinidad (por ejemplo, el anticuerpo) puede marcarse directamente (por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorescencia)

o puede detectarse indirectamente (por ejemplo, mediante la unión de un reactivo de afinidad secundario marcado con un reactivo de antiafinidad). Por tanto, se apreciará que se puede marcar directamente un "reactivo de afinidad marcado", por ejemplo, mediante conjugación con un fluoróforo, o marcarse indirectamente.

- 5 En otro enfoque, se incorpora un análogo de nucleótido que comprende un grupo de bloqueo reversible en el terminal 3' de la GDS y, después de la detección del evento de unión, se eliminan el grupo de bloqueo reversible y el reactivo de afinidad. En este enfoque, cada ciclo de secuenciación incluye: (i) incorporar un NLRT que comprende un grupo de bloqueo por una ADN polimerasa, seguido opcionalmente por lavado de los NLRT no incorporados; (ii) eliminar el grupo de bloqueo de una manera que regenera un grupo hidroxilo (OH) en la
- 10 posición 3' del desoxirribonucleótido; (iii) eliminar el grupo de bloqueo permite la incorporación de un análogo de nucleótido adicional (por ejemplo, produce un grupo hidroxilo en la posición 3' de un resto de desoxirribosa) poniendo en contacto el análogo de nucleótido incorporado con un reactivo de afinidad marcado que reconoce y se une específicamente al NLRT incorporado; (iii) detección de la unión del reactivo de afinidad, y (v) eliminar el reactivo de afinidad. Este paso puede ir seguido de un nuevo ciclo o ciclos en los que se incorpora y detecta
- 15 un nuevo análogo de nucleótido. El reactivo de afinidad (por ejemplo, el anticuerpo) puede marcarse directamente (por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorescencia) o puede detectarse indirectamente (por ejemplo, mediante la unión de un reactivo de afinidad secundario marcado con un reactivo de antiafinidad). Por tanto, se apreciará que se puede marcar directamente un "reactivo de afinidad marcado", por ejemplo, mediante conjugación con un fluoróforo, o marcarse indirectamente.
- 20 SBS implica dos o más ciclos de extensión del cebador en los que se incorpora un nucleótido en el terminal 3' del cebador extendido. La presente invención utiliza reactivos de afinidad, tales como anticuerpos, para (i) detectar el nucleótido incorporado en el terminal 3' del cebador extendido ("nucleótido terminal 3'") e (ii) identificar la nucleobase de ese nucleótido terminal 3' y distinguir una nucleobase de otra (por ejemplo, A de G). Sin pretender limitarse a un mecanismo específico, esto es posible porque cada reactivo de afinidad está
- 25 diseñado para distinguir un nucleótido terminal 3' de otros nucleótidos "internos" del cebador extendido, incluso cuando el nucleótido terminal 3' y los nucleótidos internos comprenden la misma nucleobase. Cada reactivo de afinidad (o en algunos casos combinación de reactivos de afinidad) también está diseñado para detectar propiedades de un nucleótido terminal 3' que identifica la nucleobase asociada con el nucleótido terminal 3'. Se proporcionan una serie de estrategias, métodos y materiales para llevar a cabo estos y otros pasos. Esta sección proporciona una descripción general en la que se omiten muchas variaciones, y no debe considerarse limitante de ninguna manera.
- 30

- En algunos enfoques, se llevan a cabo las reacciones de SBS de la invención utilizando nucleótidos con fracciones terminadoras reversibles en 3'. En estos enfoques, el nucleótido terminal 3' incorporado difiere de los nucleótidos internos con base en la presencia de la unidad estructural terminadora reversible. Por tanto, un
- 35 reactivo de afinidad que se une a una unidad estructural terminadora reversible en un cebador extendido se une (y por lo tanto detecta) al nucleótido terminal 3', distinguiéndolo de los nucleótidos internos. En un enfoque diferente, el nucleótido 3' terminal incorporado difiere de los nucleótidos internos con base en la presencia de un grupo 3'-OH (hidroxilo) libre que no está presente en los nucleótidos internos. Por lo tanto, un reactivo de afinidad que se une a un grupo 3'-OH libre en un cebador extendido se une al nucleótido terminal 3', (y por lo tanto detecta) el nucleótido terminal 3', distinguiéndolo de los nucleótidos internos. En algunos enfoques, el grupo 3'-OH libre se genera mediante la escisión del terminador reversible en un análogo de nucleótido incorporado. En otro enfoque, el grupo 3'-OH libre resulta de la incorporación de un nucleótido que no comprende una unidad estructural terminadora reversible, tal como un nucleótido natural. En un enfoque
- 40 adicional, combinable con cualquiera de los dos enfoques descritos anteriormente, el nucleótido terminal 3' incorporado difiere de los nucleótidos internos con base en otras diferencias estructurales características de un nucleótido terminal 3' que incluyen, pero no se limita a, una mayor accesibilidad de un reactivo de afinidad al azúcar desoxirribosa de un nucleótido terminal 3' en relación con la desoxirribosa de los nucleótidos internos, mayor accesibilidad de un reactivo de afinidad a la nucleobase de un nucleótido terminal 3' a un reactivo de afinidad en relación con la desoxirribosa de los nucleótidos internos, y otras diferencias moleculares y
- 45 conformacionales entre el nucleótido terminal 3' y los nucleósidos internos.
- 50

Así, en un aspecto de la presente invención, y como se describe en los Ejemplos siguientes, se utilizan reactivos de afinidad para detectar estas diferencias estructurales entre el nucleótido terminal 3' de un cebador extendido y otros nucleótidos.

- También se proporcionan una serie de estrategias, métodos y materiales para detectar propiedades del nucleótido terminal 3' que identifican la nucleobase del nucleótido terminal 3'. En un enfoque, se utilizan los nucleótidos de origen natural o los análogos de nucleótidos que comprenden nucleobases de origen natural (por ejemplo, A, T, C y G) en la reacción de secuenciación y se incorporan al producto de extensión del cebador. Se utilizan los reactivos de afinidad que se unen específicamente a una nucleobase (por ejemplo, A) y distinguen esa nucleobase de otras a las que no se une (por ejemplo, T, C y G) para identificar la nucleobase
- 55 del nucleótido terminal 3'. En otro enfoque, los análogos de nucleótidos que comprenden nucleobases modificadas (es decir, que no se producen de forma natural) se usan en la reacción de secuenciación y se incorporan al producto de extensión del cebador. Reactivos de afinidad que se unen específicamente a una
- 60

nucleobase modificada (por ejemplo, A modificada) y distinguen esa nucleobase modificada de otras nucleobases modificadas o naturales. Un reactivo de afinidad que se une específicamente a una nucleobase modificada generalmente reconoce la modificación, de modo que la unión a la nucleobase modificada difiere de la unión a una nucleobase natural sin la modificación. Por ejemplo, un reactivo de afinidad que se une a un análogo de adenosina en el que se reemplaza el nitrógeno en la posición 7 (N⁷) por carbono metilado (véase la Estructura XV, a continuación) puede que no se una a la nucleobase de adenosina natural (no modificada), o puede que se una con menos avidez. Sin pretender limitarse a un mecanismo en particular, se cree que un reactivo de afinidad que reconoce específicamente un resto modificado (en este caso, una nucleobase modificada) lo hace uniéndose a la característica modificada (en este caso, la porción de adenosina modificada que comprende el carbono metilado). Dicho de otra manera, el reactivo de afinidad se une a un epítipo que incluye el carbono metilado. Se entenderá que el reactivo de afinidad se une también a otras partes del nucleótido incorporado.

En otro enfoque más, se incorporan los nucleótidos con grupos de bloqueos reversibles en 3' (nucleótidos terminadores reversibles) al producto de extensión del cebador. Se eliminan los grupos de bloqueo en cada ciclo de secuenciación, de modo que solo el último nucleótido incorporado de la extensión del cebador producido comprende un grupo de bloqueo. En este enfoque se utilizan reactivos de afinidad que se unen a los grupos de bloqueo. En este enfoque, al menos dos análogos de nucleótidos (es decir, con nucleobases diferentes) utilizados en la reacción de secuenciación comprenden diferentes grupos de bloqueo. Por ejemplo, usando un primer grupo de bloqueo (por ejemplo, 3'-O-azidometilo) para un nucleótido que comprende adenina o un análogo de adenina, un segundo grupo de bloqueo diferente (por ejemplo, 3'-O-cianoetileno) para un nucleótido que comprende guanina o un análogo de guanina, etc., la especificidad del reactivo de afinidad identificará la nucleobase asociada. Por ejemplo, ampliando la ilustración anterior, si un reactivo de afinidad específico para 3'-O-cianoetileno reconoce un nucleótido terminal 3', esto indica que la nucleobase asociada es guanina o un análogo de guanina y la base plantilla en esta posición es citosina. En una variación de este enfoque, se pueden usar grupos de bloqueo que difieren solo en una pequeña característica, y el reactivo de afinidad se une a un epítipo que incluye la pequeña característica distintiva.

Como se describe a continuación, en un aspecto de la presente invención, se utilizan reactivos de afinidad que reconocen y se unen específicamente a nucleótidos o análogos de nucleótidos con base en una combinación de características estructurales (por ejemplo, un reactivo de afinidad que reconoce un grupo bloqueador particular y una nucleobase específica con modificaciones particulares). En este aspecto, se diseñan y/o seleccionan los nucleótidos o análogos de nucleótidos por la propiedad de ser reconocidos por un reactivo de afinidad específico. En algunos casos, un reactivo de afinidad que se une a múltiples características estructurales tiene la ventaja de una unión del reactivo de afinidad más fuerte y más específica. La TABLA A, a continuación, es una colección no exhaustiva de ejemplos de diferencias estructurales que pueden ser reconocidas por un reactivo de afinidad para distinguir nucleótidos que tienen nucleobases diferentes (2^a columna) y las fracciones en el último nucleótido incorporado que pueden unirse mediante un reactivo de afinidad para proporcionar suficiente eficiencia de unión y/o que distingue el último nucleótido incorporado de los nucleótidos internos con base en esas características (3^{ra} columna).

TABLA A

Clase de reactivo de afinidad	(Especificidad) Distingue el nucleótido incorporado con base en	Elementos del último nucleótido incorporado unido por reactivo de afinidad
A	Diferencias en las nucleobases naturales (por ejemplo, A, T, C, G)	1. Nucleobase y azúcar;
		2. Grupo de nucleobase y bloqueo;
		3. Grupo de nucleobase y bloqueo y azúcar;
B	Diferencias en nucleobases naturales junto con características modificadas de análogos de nucleobase (o "nucleobase modificadas")	1. Características modificadas de los análogos de nucleobase;
		2. Características modificadas de análogos de nucleobase y azúcar;
		3. Nucleobases naturales, características modificadas de los análogos de nucleobases y grupo de bloqueo;
		4. Nucleobases naturales, características modificadas de los análogos de nucleobases y grupo de bloqueo;

C	Diferencias en las bases naturales combinadas con diferencias en los grupos de bloqueo (al menos en algunos NLRT)	1. Nucleobase y variaciones en la estructura del grupo de bloqueo o grupo de bloqueo completo; o
		2. Nucleobase, variaciones en la estructura del grupo de bloqueo o grupo de bloqueo completo y azúcar;
D	Diferencias en los grupos de bloqueo	1. Diferentes grupos de bloqueo y/o variaciones en grupos de bloqueo similares;
		2. Diferentes grupos de bloqueo y/o variaciones en grupos de bloqueo similares, nucleobase (natural o modificada); o
		3. Diferentes grupos de bloqueo y/o variaciones en grupos de bloqueo similares, nucleobase (natural o modificada) y azúcar;
E	Diferencias en las nucleobases naturales combinadas con modificaciones específicas de nucleobases de al menos algunas nucleobases y diferencias en los grupos de bloqueo de al menos algunos NLRT	1. Nucleobases naturales, características modificadas de los análogos de nucleobases y grupo de bloqueo; o
		2. Nucleobases naturales, características modificadas de análogos de nucleobase y grupo de bloqueo y azúcar.

Como se analiza en detalle a continuación, la porción del análogo de nucleótido incorporado al que se une el reactivo de afinidad marcado puede incluir, por ejemplo y sin limitación, la nucleobase y el grupo de bloqueo, o la nucleobase y/o el grupo de bloqueo en combinación con la unidad estructural de azúcar del análogo de nucleótido. Véase la Tabla A, a continuación. La unión del reactivo de afinidad marcado puede depender de la posición del nucleótido objetivo, por ejemplo, distinguir entre un análogo de nucleótido que tiene un grupo de bloqueo en el extremo 3' del GDS y un análogo de nucleótido similar (que carece del grupo de bloqueo) que está ubicado dentro o dentro del GDS. La unión del reactivo de afinidad marcado también depende de la nucleobase misma, de modo que se unen los reactivos de afinidad a un NLRT objetivo (por ejemplo, NLRT-A) incorporado al final de un GDS en una posición en una matriz, pero no a otros NLRT (por ejemplo, NLRT-C, -T o -G) incorporados al final de un GDS en una posición diferente en una matriz.

La presente invención tiene ventajas sobre otros métodos de SBS. La eliminación del reactivo de afinidad marcado no deja una "cicatriz" química resultante de los grupos que quedan unidos al dNTP después de la escisión de un enlazador. Esto es ventajoso porque dichas "cicatrices" pueden reducir la eficacia de la incorporación de dNTP por parte de la polimerasa. Además, en este enfoque, el reactivo de afinidad puede incluir múltiples fracciones fluorescentes y proporcionar una señal más fuerte que un solo tinte fluorescente unido a un dNTP de acuerdo con los métodos comúnmente utilizados. Este enfoque también puede causar menos fotodaño, ya que se puede usar una potencia de excitación más baja o tiempos de exposición más cortos. Se espera que el enfoque divulgado en el presente documento permita lecturas más largas (por ejemplo, lecturas de más de 500 bases o más de 1.000 bases) y/o lecturas más precisas de más de 50, 100 o 200 bases (por ejemplo, con menos errores de uno en 2000 bases o uno en 5000 bases). Las composiciones y los métodos de la presente invención también pueden ser más económicos que los métodos de terminador reversible (RT) marcado comúnmente usados para SBS. Los RT sin marcación cuestan menos que los RT marcados. En SBS estándar que utiliza RT marcados, se utilizan altas concentraciones de RT marcados para llevar a cabo la incorporación del RT y la mayoría de los RT marcados (70-99 % o más) no se incorporan a la polimerasa y se eliminan por lavado. El uso de RT sin marcar de menor coste reduce este coste. Además, en el paso de marcación de la presente invención, en el que se usa un reactivo de afinidad marcado, puede ser suficiente que solo un pequeño porcentaje de las plantillas objetivo estén unidas por un reactivo de afinidad que tenga múltiples, incluso 30 % puede ser suficiente con aglutinantes marcados de manera eficiente con múltiples moléculas de marcador a una molécula de aglutinante; que va a ser marcada (por ejemplo, aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o menos del 15 %, menos del 20 %, menos del 25 % o menos del 30 %) para obtener una señal suficiente para la formación de imágenes, particularmente si el reactivo de afinidad se une eficientemente al dNTP objetivo y comprende múltiples moléculas marcadoras. Se puede preferir un nivel más alto de unión si el reactivo de afinidad lleva solo una molécula marcadora (por ejemplo, 70 por ciento o más).

2. Definiciones y Términos

Como se usa en el presente documento, en el contexto de un análogo de nucleótido, los términos "sin marcar" y "sin marcación" se usan indistintamente.

Como se usa en el presente documento, a menos que se desprenda lo contrario del contexto, "terminador reversible [nucleótido] sin marcación", "NLRT", "nucleótido terminador reversible", "terminador reversible", "RT" y similares se usan para referirse a un reactivo de secuenciación que comprende una nucleobase o análogo, desoxirribosa o análogo, y un grupo de bloqueo escindible. Un nucleótido terminador reversible sin marcación puede referirse a un dNTP (es decir, un sustrato para la polimerasa) o un nucleótido terminador reversible incorporado en un producto de extensión del cebador, inicialmente en el terminal 3' y, luego de ciclos de incorporación adicionales, si los hay, en una porción interna" del producto de extensión del cebador.

Como se usa en el presente documento, un "dNTP" incluye tanto trifosfatos de desoxirribonucleótidos naturales como análogos de los mismos, incluyendo los análogos con un grupo de bloqueo escindible en 3'-O.

Como se usa en el presente documento, en el contexto de un grupo de bloqueo escindible de un análogo de nucleótido, la designación 3'-O-" a veces está implícita en lugar de explícita. Por ejemplo, los términos "azidometilo", "3'-O-azidometilo" son intercambiables como será evidente por el contexto.

"Amplicon" significa el producto de una reacción de amplificación de polinucleótidos, es decir, una población de polinucleótidos que se replican a partir de una o más secuencias iniciales. Los amplicones se pueden producir mediante una variedad de reacciones de amplificación, incluyendo, pero sin limitarse a, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), reacciones de polimerasa lineal, amplificación con base en secuencias de ácidos nucleicos, amplificación de círculo rodante y reacciones similares (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. Nos. 4,683,195; 4,965,188; 4,683,202; 4,800,159; 5,210,015; 6,174,670; 5,399,491; 6,287,824 y 5,854,033; y publicación de EE. UU. No. 2006/0024711).

"Antígeno", tal como se usa en el presente documento, significa un compuesto que puede unirse específicamente a un anticuerpo. Algunos antígenos son inmunógenos (véase, Janeway, et al., Immunobiology, 5th Edition, 2001, Garland Publishing). Algunos antígenos son haptenos que son reconocidos por un anticuerpo pero que no provocan una respuesta inmunitaria a menos que se conjuguen con una proteína. Los antígenos ejemplares incluyen los NLRT, grupos de bloqueo de terminadores reversibles, dNTP, polipéptidos, moléculas pequeñas, lípidos o ácidos nucleicos.

"Matriz" o "micromatriz" se refiere a un soporte sólido (o colección de soportes sólidos, tales como perlas) que tiene una superficie, preferiblemente, pero no exclusivamente, una superficie plana o sustancialmente plana, que lleva una colección de sitios que comprenden ácidos nucleicos de manera que cada sitio de la colección está espacialmente definido y no se superpone con otros sitios de la matriz; es decir, los sitios son espacialmente discretos. La matriz o micromatriz también puede comprender una estructura interrogable no plana con una superficie tal como una perla o un pozo. Los oligonucleótidos o polinucleótidos de la matriz se pueden unir covalentemente al soporte sólido o se pueden unir de forma no covalente. La tecnología de micromatrices convencional se revisa en, por ejemplo, Scena, Ed. (2000), Microarrays: A Practical Approach (IRL Press, Oxford). Como se usa en el presente documento, "matriz aleatoria" o "micromatriz aleatoria" se refiere a una micromatriz en la que la identidad de los oligonucleótidos o polinucleótidos no es discernible, al menos inicialmente, a partir de su ubicación, pero puede determinarse mediante una técnica de detección bioquímica particular en la matriz. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. Nos. 6,396,995; 6,544,732; 6,401,267; y 7,070,927; Publicaciones PCT WO 2006/073504 y 2005/082098; y Publicación de Patente de EE. UU. No. 2007/0207482 y 2007/0087362.

Los términos "reversible", "eliminable" y "escindible" en referencia a un grupo de bloqueo tienen el mismo significado.

Los términos "grupo de bloqueo reversible" de un nucleótido terminador reversible también pueden denominarse "grupo de bloqueo eliminable", "enlazador escindible", "unidad estructural de bloqueo", "grupo de bloqueo", "grupo de bloqueo de terminador reversible" y similares. Un grupo de bloqueo reversible es una unidad estructural química unida al azúcar de nucleótido (por ejemplo, desoxirribosa), normalmente en la posición 3'-O de la unidad estructural de azúcar, que evita la adición de un nucleótido por parte de una polimerasa en esa posición. Un grupo de bloqueo reversible puede ser escindido por una enzima (por ejemplo, una fosfatasa o esterasa), reacción química, calor, luz, etc., para proporcionar un grupo hidroxilo en la posición 3' del nucleósido o nucleótido de tal manera que la adición de un nucleótido por una polimerasa puede ocurrir.

"Derivado" o "análogo" significa un compuesto o molécula cuya estructura central es igual o muy parecida a la de un compuesto original, pero que tiene una modificación química o física, tal como un grupo lateral diferente o adicional, o grupos de bloqueo 2' y/o 3', lo que permite que el nucleótido o nucleósido derivado se una a otra molécula. Por ejemplo, la base puede ser una deazapurina. Los derivados deben ser capaces de experimentar el emparejamiento de Watson-Crick. "Derivado" y "análogo" también significan un nucleótido sintético o derivado de nucleósido que tiene fracciones de base modificados y/o fracciones de azúcar modificados. Dichos derivados y análogos se discuten en, por ejemplo, Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley & Son, 1980) and

Uhlman et al., Chemical Reviews 90:543-584, 1990. Los análogos de nucleótidos también pueden comprender enlaces fosfodiéster modificados, incluyendo enlaces fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, fosforanilidato y fosforamidato. Los análogos deben ser capaces de experimentar el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, los análogos de desoxiadenosina incluyen didanosina (ddI) y vidarabina, y los análogos de adenosina incluyen BCX4430; los análogos de desoxicitidina incluyen citarabina, gemcitabina, emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC) y zalcitabina (ddC); los análogos de guanosa y desoxiguanosina incluyen abacavir, aciclovir y entecavir; los análogos de timidina y desoxitimidina incluyen estavudina (d4T), telbivudina y zidovudina (azidotimidina o AZT); y los análogos de desoxiuridina incluyen idoxuridina y trifluridina. "Derivado", "análogo" y "modificado" como se usa en el presente documento, se pueden usar indistintamente y están abarcados por los términos "nucleótido" y "nucleósido" definidos en el presente documento.

"Incorporar" significa convertirse en parte de una molécula de ácido nucleico. En SBS, la incorporación de un RT ocurre cuando una polimerasa agrega un RT a una cadena de ADN en crecimiento a través de la formación de un enlace fosfodiéster o fosfodiéster modificado entre la posición 3' de la pentosa de un nucleótido, es decir, el nucleótido 3' en la cadena de ADN y la posición 5' de la pentosa en un nucleótido adyacente, es decir, se agrega el RT a la cadena de ADN.

"Marcador", en el contexto de un reactivo de afinidad marcado, significa cualquier átomo o molécula que pueda usarse para proporcionar una señal detectable y/o cuantificable. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores de masa, partículas densas en electrones, partículas magnéticas, marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores y sustratos enzimáticos. En algunas realizaciones, el marcador de detección es una molécula que contiene un grupo cargado (por ejemplo, una molécula que contiene un grupo catiónico o una molécula que contiene un grupo aniónico), una molécula fluorescente (por ejemplo, un tinte fluorescente), una molécula fluorogénica o un metal. Opcionalmente, el marcador de detección es un marcador fluorogénico. Un marcador fluorogénico puede ser cualquier marcador que sea capaz de emitir luz cuando esté en una forma no atenuada (por ejemplo, cuando no esté atenuada por otro agente). La unidad estructural fluorescente emite energía luminosa (es decir, emite fluorescencia) a una longitud de onda de emisión específica cuando es excitada por una longitud de onda de excitación apropiada. Cuando la unidad estructural fluorescente y una unidad estructural de atenuación están muy cerca, la energía luminosa emitida por la unidad estructural fluorescente es absorbida por la unidad estructural de atenuación. En algunas realizaciones, el tinte fluorogénico es una fluoresceína, una rodamina, una fenoxazina, una acridina, una cumarina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el tinte fluorogénico es una carboxifluoresceína. Otros ejemplos de tintes fluorogénicos adecuados incluyen los tintes fluorogénicos disponibles comercialmente bajo Alexa Fluor® línea de productos (Life Technologies, Carlsbad, CA). Alternativamente, se pueden usar marcadores no fluorogénicos, incluyendo, sin limitación, marcadores redoxgénicos, marcadores de reducción, moléculas que contienen tio o tiol, alquilo sustituidos o no sustituidos, proteínas fluorescentes, tintes no fluorescentes y proteínas luminiscentes.

"Nucleobase" significa una base nitrogenada que puede aparearse con una base nitrogenada complementaria de un ácido nucleico plantilla. Los ejemplos de nucleobases incluyen adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracilo (U), inosina (I) y derivados de estos. Las referencias a la timina en el presente documento deben entenderse que se refieren igualmente al uracilo a menos que se aclare lo contrario del contexto. Como se usa en el presente documento, los términos "nucleobase", "base nitrogenada" y "base" se usan indistintamente.

Una "nucleobase de origen natural", como se usa en el presente documento, significa adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) o uracilo (U). En algunos casos, la nucleobase natural se refiere a A, C, G y T (las bases naturales que se encuentran en el ADN).

Un "nucleótido" consiste en una nucleobase, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Son unidades monoméricas de una secuencia de ácido nucleico. En el ARN, el azúcar es una ribosa, y en el ADN, una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la ribosa. La base nitrogenada es un derivado de purina o pirimidina. Las purinas son adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas son citosina (C) y timina (T) (o en el contexto del ARN, uracilo (U)). El átomo C-1 de la desoxirribosa está unido al N-1 de una pirimidina o al N-9 de una purina. Un nucleótido también es un éster de fosfato o un nucleósido, y la esterificación se produce en el grupo hidroxilo unido al C-5 del azúcar. Los nucleótidos suelen ser mono, di o trifosfatos. Un "nucleósido" es estructuralmente similar a un nucleótido, pero no incluye las fracciones de fosfato. Las abreviaturas comunes incluyen "dNTP" para desoxinucleótido trifosfato.

"Ácido nucleico" significa un polímero de monómeros de nucleótidos. Como se usa en el presente documento, los términos pueden referirse a formas de cadena simple o doble. Los monómeros que componen los ácidos nucleicos y los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido natural mediante un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tal como el tipo de emparejamiento de bases de Watson-Crick, el apilamiento de bases, los tipos emparejamiento de bases de Hoogsteen o Hoogsteen inverso o similares, para formar formas dúplex o tríplex. Dichos monómeros y sus enlaces internucleosídicos pueden ser de origen natural o pueden ser análogos de los mismos, por ejemplo, análogos de origen natural o no

natural. Los análogos de origen no natural pueden incluir ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, enlaces internucleosídicos de fosforotioato, bases que contienen grupos de enlace que permiten la unión de marcadores, tales como fluoróforos o haptenos, y similares. Los ácidos nucleicos varían típicamente en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, 5-40, cuando normalmente se denominan "oligonucleótidos", hasta varios cientos de miles o más de unidades monoméricas. Siempre que un ácido nucleico u oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tal como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitidina, "G" indica desoxiguanosina y "T" indica timidina, "I" indica desoxiinosina, "U" indica uridina, a menos que se indique lo contrario o sea obvio por el contexto. A menos que se indique lo contrario, la terminología y las convenciones de numeración de átomos seguirán las divulgadas en Strachan y Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, Nueva York, 1999). Por lo general, los ácidos nucleicos comprenden los nucleósidos naturales (por ejemplo, desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina para el ADN o sus equivalentes de ribosa para el ARN) unidos por enlaces fosfodiéster; sin embargo, también pueden comprender análogos de nucleótidos no naturales, por ejemplo, bases modificadas, azúcares o enlaces internucleosídicos. Para los expertos en la técnica, cuando una enzima tiene requisitos específicos de sustrato de oligonucleótidos o ácidos nucleicos para la actividad, por ejemplo, ADN monocatenario, dúplex de ARN/ADN, o similares, entonces la selección de la composición apropiada para los sustratos de oligonucleótidos o ácidos nucleicos está bien dentro del conocimiento de alguien con habilidades ordinarias, especialmente con la guía de tratados, tales como Sambrook et al., Molecular Cloning, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989), y referencias similares.

"Cebador" significa un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que es capaz, al formar un dúplex con una plantilla polinucleotídica, de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico y extenderse desde su extremo 3' a lo largo de la plantilla para que se forma un dúplex extendido. La secuencia de nucleótidos añadidos durante el proceso de extensión está determinada por la secuencia del polinucleótido plantilla. Por lo general, los cebadores se extienden mediante una ADN polimerasa. Los cebadores normalmente tienen una longitud en el intervalo de 9 a 40 nucleótidos, o en algunas realizaciones, de 14 a 36 nucleótidos.

"Polinucleótido" se usa indistintamente con el término "ácido nucleico" para referirse a ADN, ARN y ácidos nucleicos híbridos y sintéticos y puede ser monocatenario o bicatenario. Los "oligonucleótidos" son polinucleótidos cortos de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. "Polinucleótido complementario" se refiere a un polinucleótido complementario a un ácido nucleico objetivo.

"Soporte sólido" y "soporte" se usan indistintamente y se refieren a un material o grupo de materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. Las micromatrices normalmente comprenden al menos un soporte plano en fase sólida, tal como un portaobjetos de microscopio de vidrio.

Tal como se usa en el presente documento y en las cláusulas adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una polimerasa" se refiere a un agente o a mezclas de dichos agentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y/o métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños que también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos también se incluyen en la invención.

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para evitar oscurecer la invención.

Aunque la presente invención se describe principalmente con referencia a realizaciones específicas, también se prevé que otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la presente divulgación.

La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro de los

conocimientos de la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen la síntesis de matrices poliméricas, la hibridación, la unión y la detección de la hibridación utilizando un marcador. Se pueden obtener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas con referencia al ejemplo que se incluye a continuación. Sin embargo, también pueden usarse, por supuesto, otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar tal como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual todo de Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) Biochemistry (4ta Ed.) Freeman, N.Y., Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3ra Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y. y Berg et al. (2002) Biochemistry, 5ta Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y.

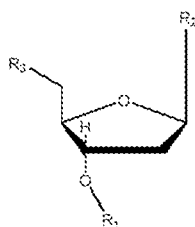
3. Nucleótidos y análogos de nucleótidos

En diversas realizaciones, SBS de acuerdo con la invención puede usar terminadores reversibles sin marcación ("NLRT") (por ejemplo, un análogo de nucleótido con un grupo de bloqueo), nucleótidos naturales sin marcación (por ejemplo, dATP, dTTP, dCTP y dGTP), o análogos de nucleótidos sin marcación que no incluyen un grupo de bloqueo.

3.1 Terminadores reversibles sin marcación (NLRT)

Los terminadores reversibles sin marcación ("NLRT") de la invención son análogos de nucleótidos que comprenden un grupo de bloqueo eliminable en la posición 3'-OH de la desoxirribosa. Aunque se han descrito numerosos terminadores reversibles, y los terminadores reversibles se usan ampliamente en SBS, los terminadores reversibles sin marcación usados de acuerdo con la presente invención difieren de los de uso comercial porque no están marcados y porque se usan junto con los reactivos de afinidad descritos en el presente documento a continuación. En un aspecto, los NLRT de la invención no están marcados. En una realización, sin marcación significa que el NLRT no comprende un tinte fluorescente. En una realización, sin marcación significa que el NLRT no comprende un tinte quimioluminiscente. En una realización, sin marcación significa que el NLRT no comprende una unidad estructural emisora de luz.

En algunas realizaciones, los NLRT ejemplares tienen la Estructura I, a continuación, antes de la incorporación del NLRT en una cadena de ADN.



Estructura I

donde R_1 es un grupo bloqueador reversible en 3'-O, R_2 es, o incluye, la nucleobase; y R_3 comprende al menos un grupo fosfato o análogo del mismo.

Se pueden eliminar los grupos de bloqueo reversibles R_1 después de la incorporación del NLRT en una cadena de ADN. Después de la incorporación del análogo en el terminal 3' de una cadena de ADN, la eliminación del grupo de bloqueo da como resultado un 3'-OH. Puede usarse cualquier grupo de bloqueo reversible. A continuación, se describen ejemplos de grupos de bloqueo reversibles.

Bases nucleares R_2 pueden ser, por ejemplo, adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracilo (U) o inosina (I) o análogos de los mismos. Se pueden denominar los NLRT de acuerdo con la nucleobase; por ejemplo, un NLRT que tiene una nucleobase A se denomina NLRT-A. Por lo tanto, se denominan los NLRT correspondientes en el presente documento "NLRT-A", "NLRT-C", "NLRT-G", "NLRT-T", "NLRT-U" y "NLRT-I", respectivamente. Se pueden denominar NLRT-T y NLRT-C como NLRT-pirimidinas. Se pueden denominar NLRT-G y NLRT-A como NLRT.

Base nuclear R_2 puede ser cualquier nucleobase o análogo de nucleobase (por ejemplo, un análogo de adenina, citosina, guanina, timina, uracilo o inosina). Por ejemplo, se puede realizar una modificación de la nucleobase de origen natural para aumentar la respuesta inmunitaria al análogo cuando se generan anticuerpos, o para aumentar la especificidad de los anticuerpos para una nucleobase específica.

R_3 pueden ser 1-10 grupos fosfato o análogos de fosfato. Los análogos de fosfato incluyen fosforotioato (PS), en el que el enlace de fosforotioato sustituye un átomo de azufre por un oxígeno no puente en el esqueleto de

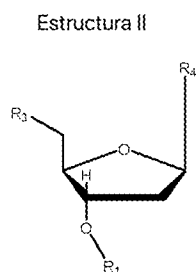
fosfato del ADN, o cualquier otro análogo de fosfato adecuado conocido en la técnica. En algunos casos, R_3 puede ser 1-10 grupos fosfato. En algunos casos, R_3 puede ser 3-12 grupos fosfato. En algunos casos, el análogo de nucleótido es un nucleósido trifosfato.

5 En ciertas realizaciones R_1 de Fórmula I tiene un MW inferior a 184, a menudo inferior a 174, a menudo inferior a 164, a menudo inferior a 154, a menudo inferior a 144, a menudo inferior a 134, a menudo inferior a 124, a menudo inferior a 114, a menudo inferior a 104, a menudo inferior a 94 y, a veces, inferior a 84. R_1 puede actuar como un hapteno y provocar una respuesta inmunitaria cuando se conjuga con una molécula transportadora más grande, tal como KLH.

10 Se apreciará que el análogo de nucleótido NLRT no incorporado es adecuado como sustrato para una enzima con actividad de ADN polimerasa y puede incorporarse en una cadena de ADN en el extremo 3'. Por ejemplo, el grupo de bloqueo reversible debe tener un tamaño y una estructura tales que el NLRT sea un sustrato para al menos algunas ADN polimerasas. Se puede lograr la incorporación de un NLRT a través de una transferasa terminal, una polimerasa o una transcriptasa inversa. Puede emplearse cualquier ADN polimerasa utilizada en la secuenciación, incluyendo, por ejemplo, una ADN polimerasa de *Thermococo* sp., tal como 9° N o mutantes del mismo, incluyendo A485L, incluyendo el doble mutante Y409V y A485L. Como se sabe en la técnica, las polimerasas discriminan mucho con respecto a la naturaleza del grupo de bloqueo 3'. Como resultado, a menudo se necesitan mutaciones en la proteína polimerasa para impulsar una incorporación eficiente. Ejemplos de ADN polimerasas y métodos que pueden usarse en la invención incluyen los descritos en Chen, C., 2014, "DNA Polymerases Drive DNA Sequencing-By-Synthesis Technologies: Both Past and Present" *Frontiers in Microbiology*, Vol. 5, Article 305, Pinheiro, V. et al. 2012 "Polymerase Engineering: From PCR and Sequencing to Synthetic Biology" *Protein Engineering Handbook: Volumen 3*: 279-302. Publicaciones de patentes internacionales WO2005/024010 y WO2006/120433. En algunos casos, la polimerasa es ADN polimerasa de *Thermococcus* sp., tal como 9° N o mutantes de la misma, incluyendo A485L, incluyendo la doble mutante Y409V y A485L. Otros ejemplos incluyen *E. coli* ADN polimerasa I, fragmento Klenow de ADN polimerasa I, ADN polimerasa de bacteriófago T7 o T5, transcriptasa inversa de VIH; polimerasa Phi29 y ADN polimerasa Bst.

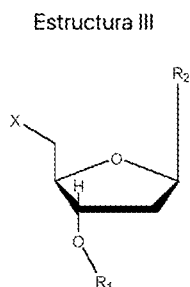
Se entenderá que las modificaciones al grupo de bloqueo no deberían interferir con la función terminadora reversible. Es decir, deberían poder escindirse para producir un desoxirribonucleótido 3'-OH.

30 En una realización, los RT tienen la Estructura II, a continuación, antes de la incorporación del RT en una cadena de ADN.



donde R_1 es un grupo bloqueador reversible en 3'-O, R_4 es una nucleobase seleccionada de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U); y R_3 comprende al menos uno (por ejemplo, 1-10) fosfato. En algunos casos, R_3 es trifosfato.

35 En una realización, los RT tienen la Estructura III, a continuación, después de la incorporación del RT en una cadena de ADN.

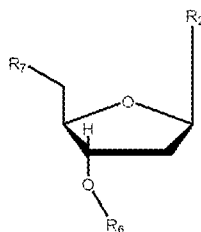


40 donde R_1 es un grupo de bloqueo reversible 3'-O, R_2 es una nucleobase tal como adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracilo (U) o inosina (I) o sus análogos, y X es un polinucleótido (por ejemplo, GDS) que comprende 10-1000 nucleósidos unidos por enlaces fosfato-azúcar (por ejemplo, enlaces fosfodiéster que

unen el átomo de carbono 3' de una molécula de azúcar nucleósido y el átomo de carbono 5' de otra molécula de azúcar nucleósido).

En otra realización, los RT tienen la Estructura IV, después de la incorporación y eliminación del grupo de bloqueo reversible.

Estructura IV



R_6 es H y R_7 es un polinucleótido (por ejemplo, GDS) que comprende de 10 a 1000 nucleósidos unidos por enlaces fosfato-azúcar, como se define anteriormente, o es R_3 , como se define anteriormente.

En ciertas realizaciones de las Estructuras I, III y IV, R_2 es un análogo de nucleobase (por ejemplo, un análogo de A, T, G, C, U) con modificaciones que no cambian la especificidad de unión de la base (es decir, un análogo se une a T, el análogo de T se une a, etc.) y (ii) pero que puede hacer que el análogo sea más inmunogénico que la base natural. En algunas realizaciones, la modificación puede comprender adiciones de un grupo que comprende no más de 3 carbonos. El grupo añadido no se elimina de los nucleósidos a medida que se incorporan a la GDS, de modo que la GDS comprende una pluralidad de nucleótidos que comprenden la modificación. En tales realizaciones, el reactivo de afinidad se une al análogo de nucleótido terminal, incluyendo la modificación, pero se une a los nucleótidos internos con la modificación con una afinidad mucho menor.

En aplicaciones en las que hay más de un nucleótido terminal en un extremo dado (por ejemplo, extremo 3'), se pueden utilizar diversos métodos para bloquear extremos que no son de interés, por ejemplo, mediante diferentes grupos de bloqueo o adjuntando el extremo "contaminante" a un soporte. Para la secuenciación de DNB, por ejemplo, puede haber extremos 3' además del extremo 3' que se usa para la secuenciación. En los grupos de PCR producidos por PCR puente, las plantillas de secuenciación están unidas por el extremo 5', por lo que el extremo 3' de la plantilla no se puede extender con RT o se modifica para evitar la unión con los aglutinantes moleculares descritos aquí.

3.2 Grupos de bloqueo de terminadores reversibles

Un NLRT utilizado en la presente invención puede incluir cualquier grupo de bloqueo adecuado. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo adecuado es uno que puede eliminarse mediante un tratamiento químico o enzimático para producir un grupo 3'-OH. Un tratamiento químico no debería degradar significativamente la cadena de extensión de plantilla o cebador. Se han descrito diversas fracciones moleculares para el grupo de bloqueo 3' de los terminadores reversibles, como un grupo 3'-O-alilo (Ju et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 103: 19635-19640, 2006), 3'-O-azidometil-dNTPs (Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 105, 9145-9150, 2008), grupos aminoalcoxilo (Hutter et al., Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 29:879-895, 2010) y el grupo 3'-O-(2-cianoetilo) (Knapp y col., Chem. Eur. J., 17, 2903 - 2915, 2011). Los grupos de bloqueo de RT ejemplares incluyen -O-azidometilo y -O-cianoetenilo. En las FIGURAS 3 y 4 se muestran otros grupos de bloqueo del RT ejemplares, con fines ilustrativos y no limitativos.

En otras realizaciones, R_1 de Fórmula I (*supra*) es un alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquínico sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heteroalqueno sustituido o no sustituido, o heteroalquínico sustituido o no sustituido. En algunos ejemplos, R_1 puede seleccionarse del grupo que consiste en alenilo, cis-cianoetenilo, trans-cianoetenilo, cis-cianofluoroetenilo, trans-cianofluoroetenilo, cis-trifluorometiletenilo, trans-trifluorometiletenilo, biscianoetenilo, bisfluoroetenilo, cis-propenilo, trans-propenilo, nitroetenilo, acetoetenilo, metilcarbonoetenilo, amidoetenilo, metilsulfonoetenilo, metilsulfonoetilo, formimidato, formhidroximato, viniloetenilo, etilenoetenilo, cianoetilenilo, nitroetilenilo, amidoetilenilo, 3-oxobut-1-inoilo y 3-metoxi-3-oxoprop-1-inoilo.

Se puede usar una variedad de grupos de bloqueos reversibles en 3'-O (R_1 en la Fórmula I) en la práctica de la invención. De acuerdo con una realización de los métodos de la invención, R_1 se selecciona del grupo que consiste en alilo, azidometilo, aminoalcoxilo, 2-cianoetilo, alquilo sustituido, alquilo no sustituido, alqueno sustituido, alqueno no sustituido, alquínico sustituido, alquínico no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, heteroalquénico sustituido, heteroalquénico no sustituido, heteroalquínico sustituido, heteroalquínico no sustituido, alenilo, cis-cianoetenilo, trans-cianoetenilo, cis-cianofluoroetenilo, trans-cianofluoroetenilo, cis-trifluorometiletenilo, trans-trifluorometiletenilo, biscianoetenilo, bisfluoroetenilo, cis-propenilo, trans-propenilo, nitroetenilo, acetoetenilo, metilcarbonoetenilo, amidoetenilo, metilsulfonoetenilo,

metilsulfonoetilo, formimidato, formhidroximato, viniloetenilo, etilenoetenilo, cianoetenilo, nitroetenilo, amidoetenilo, amino, cianoetenilo, cianoetilo, alcoxi, acilo, metoximetilo, aminoxilo, carbonilo, nitrobencilo, cumarinilo y nitronaftalenilo.

- 5 Como se usa en el presente documento, los términos "alquilo", "alquenilo" y "alquinilo" incluyen sustituyentes monovalentes de cadena lineal y ramificada. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, isobutilo, 3-butilo y similares. Los intervalos de estos grupos útiles con los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀ y alquinilo C₂-C₁₀. Intervalos adicionales de estos grupos útiles con los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ y alquinilo C₂-C₄.
- 10 Se definen "heteroalquilo", "heteroalquenilo" y "heteroalquinilo" de manera similar a alquilo, alquenilo y alquinilo, pero pueden contener heteroátomos O, S o N o combinaciones de los mismos dentro del esqueleto. Los intervalos de estos grupos útiles con los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen heteroalquilo C₁-C₁₀, heteroalquenilo C₂-C₁₀ y heteroalquinilo C₂-C₁₀. Intervalos adicionales de estos grupos útiles con los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen heteroalquilo C₁-C₈,
- 15 heteroalquenilo C₂-C₈, heteroalquinilo C₂-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, heteroalquenilo C₂-C₆, heteroalquinilo C₂-C₆, heteroalquilo C₁-C₄, heteroalquenilo C₂-C₄ y heteroalquinilo C₂-C₄.

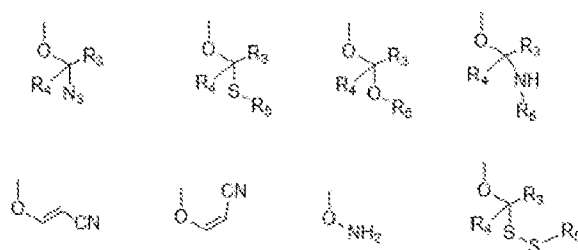
- Las moléculas de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo utilizadas en el presente documento pueden estar sustituidas o no sustituidas. Como se usa en el presente documento, el término sustituido incluye la adición de un grupo alcoxi, ariloxi, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo,
- 20 heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo a una posición unida a la cadena principal del alcoxi, ariloxi, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, por ejemplo, la sustitución de un hidrógeno por una de estas moléculas. Los ejemplos de grupos de sustitución incluyen, pero sin limitarse a, grupos hidroxí, halógeno (por ejemplo, F, Br, Cl o I) y carboxilo. Por el contrario, como se usa en el presente documento, el
- 25 término no sustituido indica que el alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo tiene un complemento completo de hidrógenos, es decir, acorde con su nivel de saturación, sin sustituciones, por ejemplo, butano lineal $-(CH_2)_3-CH_3$.

- En otras realizaciones, el grupo bloqueador reversible es un grupo bloqueador que contiene amino (por ejemplo, NH_2). Véase, Hutter et al., 2010, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 29(11), que describe
- 30 ejemplos de grupos de bloqueo reversibles que contienen amino. En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es un grupo de bloqueo que contiene alilo (por ejemplo, $CH_2=CHCH_2$). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible comprende un grupo ciano (por ejemplo, un grupo cianoetenilo o cianoetilo). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es un grupo de bloqueo que contiene azido (por ejemplo, N_3).
- 35 En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es azidometil (N_3CH_2). En algunas realizaciones, el grupo bloqueador reversible es un grupo bloqueador que contiene alcoxi (por ejemplo, CH_3CH_2O). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible contiene una unidad estructural de polietilenglicol (PEG) con una o más unidades de etilenglicol. En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es un alquilo sustituido o no sustituido (es decir, un hidrocarburo sustituido o no sustituido). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es acilo. Véase, Patente de EE. UU. No. 6,232,465. En algunas realizaciones, el
- 40 grupo de bloqueo reversible es o contiene metoximetilo. En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es o contiene aminoxilo (H_2NO). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es o contiene carbonilo ($O=CH$). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible comprende un grupo éster o fosfato.

- 45 En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es nitrobencilo ($C_6H_4(NO_2)-CH_2$). En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es cumarinilo (es decir, contiene una unidad estructural de cumarina o un derivado del mismo) en el que, por ejemplo, cualquiera de los carbonos CH del grupo de bloqueo reversible de cumarinilo está unido covalentemente al 3'-O del análogo del nucleótido.

- En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible es nitronaftaleno (es decir, contiene una unidad estructural de nitronaftaleno o un derivado del mismo) en el que, por ejemplo, cualquiera de los carbonos CH
- 50 del grupo de bloqueo reversible de nitronaftaleno está unido covalentemente al 3'-O del análogo del nucleótido.

En algunas realizaciones, el grupo de bloqueo reversible se selecciona del grupo:



Estructuras VI-XIII

donde R_3 y R_4 son H o alquilo, y R_5 es alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno y bencilo. En ciertas realizaciones, la determinación de R_3 - R_5 está restringida por las limitaciones de MW descritas en el presente documento (por ejemplo, véase la Sección 3.2.1).

- 5 Se describen otros grupos de bloqueo reversibles adecuados para usar en la presente invención en la literatura como un grupo de bloqueo de un terminador reversible marcado. En general, en la práctica de la invención puede usarse cualquier grupo de bloqueo reversible adecuado usado en la secuenciación por síntesis.

3.2.1 Propiedades de los grupos de bloqueos de terminadores reversibles y los nucleótidos que los contienen

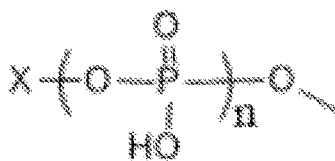
- 10 Preferiblemente, para aplicaciones de secuenciación, se puede eliminar el grupo de bloqueo de las RT bajo condiciones de reacción que no interfieren con la integridad del ADN que se está secuenciando. El grupo de bloqueo ideal exhibirá estabilidad a largo plazo, será incorporado de manera eficiente por la enzima polimerasa, causará el bloqueo total de la incorporación secundaria o posterior y tendrá la capacidad de eliminarse bajo condiciones suaves que no causen daño a la estructura del polinucleótido, preferiblemente bajo condiciones acuosas.

- 15 En determinadas realizaciones de la invención, un grupo de bloqueo (incluyendo el átomo de oxígeno 3' de desoxirribosa) tiene un peso molecular (MW) inferior a 200, a menudo inferior a 190, a menudo inferior a 180, a menudo inferior a 170, a menudo inferior a 160, a menudo inferior a 150, a menudo inferior a 140, a menudo inferior a 130, a menudo inferior a 120, a menudo inferior a 110 y, a veces, inferior a 100). Dicho de otra manera, en ciertas realizaciones R_3 de Fórmula I tiene un MW inferior a 184, a menudo inferior a 174, a menudo inferior a 164, a menudo inferior a 154, a menudo inferior a 144, a menudo inferior a 134, a menudo inferior a 124, a menudo inferior a 114, a menudo inferior a 104, a menudo inferior a 94 y, a veces, inferior a 84.

- 20 Los pesos moleculares de los monofosfatos de desoxirribonucleótidos están en el intervalo de aproximadamente 307 a 322 (dAMP 331.2, dCMP 307.2, dGMP 347.2 y dTMP 322.2). En ciertas realizaciones, la unidad estructural NLRT cuando se incorpora a una GDS (es decir, sin incluir el pirofosfato de dNTP) tiene un peso molecular inferior a 550, a menudo inferior a 540, a menudo inferior a 530, a menudo inferior a 520, a menudo inferior a 510, a menudo inferior a 500, a menudo inferior a 490, a menudo inferior a 480, a menudo inferior a 470 y, a veces, inferior a 460.

3.3 Fracciones que contienen fosfato

- 30 En algunas realizaciones, la unidad estructural de R_3 comprende una o más fracciones de fosfato y/o análogos de fosfato. En algunas realizaciones, la unidad estructural de R_3 puede tener la estructura siguiente (Estructura XIV) donde $n = 0$ a 12 (normalmente 0, 1, 3, 4, 5 o 6) y X es H o cualquier estructura compatible con la incorporación por polimerasa en una reacción de extensión del cebador. Por ejemplo, X puede ser alquilo o cualquiera de una variedad de enlaces descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. No. 9,702,001. Se apreciará que en el proceso de incorporación de un terminador reversible en una GDS, se elimina la unidad estructural X del nucleótido (junto con todo menos el fosfato alfa) de manera que X no está presente en el desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado. En ciertas realizaciones, X puede ser un marcador detectable o un marcador de afinidad, con la condición de que los reactivos de afinidad de la invención no se unan a la unidad estructural X, ni discriminan entre terminadores reversibles con base en la presencia, ausencia o estructura de la unidad estructural X, y que X no está presente en el desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado.



Estructura XIV

3.4 Conjuntos de NLRT

En algunos enfoques, la secuenciación SBS de acuerdo con la invención comprende poner en contacto una matriz de secuenciación con múltiples NLRT (por ejemplo, NLRT-A, NLRT-T, NLRT-C y NLRT-G). El contacto puede llevarse a cabo secuencialmente, un NLRT a la vez. Alternativamente, se pueden poner en contacto los cuatro NLRT con la matriz de secuenciación al mismo tiempo, más a menudo como una mezcla de los cuatro NLRT. Juntos, los cuatro NLRT forman un "conjunto NLRT". Se pueden envasar los NLRT de un conjunto de NLRT como una mezcla o se pueden envasar como un kit que comprende cada NLRT diferente en un recipiente separado. En una mezcla de los cuatro NLRT puede incluir cada base en igual proporción o puede incluir cantidades desiguales.

En una realización, cada NLRT en un conjunto de NLRT comprende el mismo grupo de bloqueo (por ejemplo, azidometilo). En una realización, los NLRT en un conjunto de NLRT comprenden diferentes grupos de bloqueo (por ejemplo, NLRT-A comprende azidometilo y NLRT-T comprende cianoetenilo; o NLRT-A y NLRT-G comprenden azidometilo y NLRT-C y NLRT-T comprenden cianoetenilo). Si se usan diferentes grupos de bloqueo, tales grupos de bloqueo se seleccionan opcionalmente de modo que se puede eliminar el grupo de bloqueo diferente mediante el mismo tratamiento. Alternativamente, se pueden seleccionar los grupos de bloqueo para ser eliminados mediante diferentes tratamientos, opcionalmente en diferentes momentos. En una realización, uno o más NLRT en un conjunto comprenden una nucleobase modificada (que no se produce de forma natural).

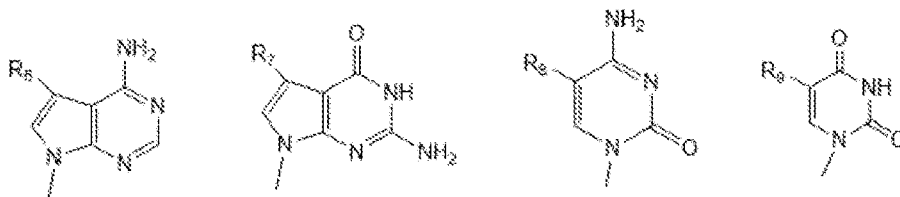
Se pueden proporcionar o utilizar los NLRT descritos en el presente documento en forma de mezcla. Por ejemplo, la mezcla puede contener dos, tres o cuatro (o más) NLRT estructuralmente diferentes. Los NLRT estructuralmente diferentes pueden diferir en sus respectivas nucleobases. Por ejemplo, la mezcla puede contener cuatro NLRT estructuralmente diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro nucleobases de ADN naturales (es decir, adenina, citosina, guanina y timina), o derivados de las mismas.

Para fines de secuenciación, se puede envasar por separado diferentes NLRT en un conjunto de NLRT y luego mezclarse en el propio secuenciador (por ejemplo, antes de la entrega a una celda de flujo) o pueden envasarse juntos (es decir, premezclarse). Se pueden proporcionar kits que comprendan juegos de NLRT (con diferentes NLRT envasados en recipientes separados o como una mezcla en el mismo recipiente).

3.5 Análogos de nucleobase con grupos que mejoran la unión de reactivos de afinidad

En una realización, la nucleobase incluye un grupo químico no eliminable que aumenta la especificidad o afinidad del reactivo de afinidad por la nucleobase cuando está presente en el terminal 3' de la cadena de ADN en crecimiento (es decir, como la última base incorporada), pero que no es reconocido por, o no es accesible a, el reactivo de afinidad en los nucleótidos internos del producto de extensión del cebador. En un enfoque, se reconoce la modificación o se une al reactivo de afinidad, pero con una afinidad más baja o una eficacia más baja en relación con la misma modificación en un nucleótido terminal 3'.

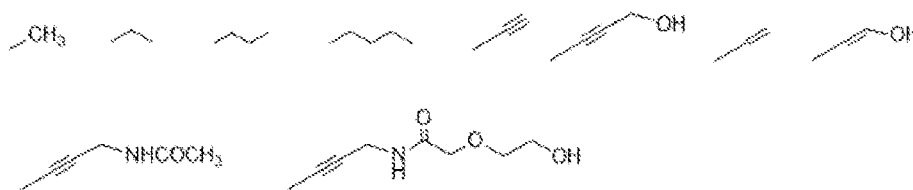
Para ilustración y no limitación, los ejemplos de tales nucleobases modificadas incluyen:



ESTRUCTURAS XV-XVIII

R₆, R₇, R₈ y R₉: pueden ser iguales o diferentes, cada uno seleccionado de H, I, Br, F, Estructuras XIX-XXVIII, o cualquier grupo que no interfiera con el emparejamiento de bases. Nótese que cuando R_g es metilo Estructura

XVIII en timidina. En algunos casos, la modificación tiene el beneficio adicional de aumentar la antigenicidad del nucleótido.



ESTRUCTURAS XIX-XXVIII

Los pesos moleculares de las nucleobases naturales son: adenina 135; guanina 151, timina 126 y citosina 111. En algunas realizaciones, el análogo de nucleobase tiene un peso molecular que no supera el de la base natural en más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 Da.

3.6 dNTP desbloqueados

En una realización, se utilizan para la secuenciación dNTP naturales (por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP o dTTP) o análogos de dNTP sin un grupo de bloqueo 3'-O. En algunas realizaciones, se incorporan los nucleótidos de uno en uno en el proceso de secuenciación, como en la pirosecuenciación o mediante una polimerasa que se detiene después de la incorporación de una base. Los métodos ejemplares se describen en la literatura (véase, por ejemplo, Ju et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 103:19635-40, 2006; Guo, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 105, 9145-50, 2008, y Ronaghi et al., Science, 281:363-365, 1998) que pueden modificarse para su uso en la presente invención eliminando un marcador y/o un enlazador que conecta el marcador al RT. En algunos enfoques, se agregan e incorporan secuencialmente los dNTP con diferentes nucleobases (por ejemplo, A, luego G, etc.). Por lo general, se obtienen imágenes de la nucleobase por separado antes de agregar el siguiente dNTP.

3.7 Análogos de desoxirribosa

En algunas realizaciones de la invención, se modifica la unidad estructural de azúcar (desoxirribosa). Por ejemplo, se pueden distinguir un NLRT con la nucleobase adenina, el grupo de bloqueo azidometilo y el azúcar desoxirribosa de un NLRT con la nucleobase citosina, el grupo bloqueador azidometilo y la desoxirribosa modificada con azúcar, usando un reactivo de afinidad de modo que reconozca el grupo de bloqueo y las unidades estructurales de azúcar.

3.8 Nucleótidos sin terminadores reversibles en 3'-O

En un aspecto diferente, útil en diversas aplicaciones, se utiliza un nucleótido con un grupo bloqueador 3' no removible (es decir, no escindible) en lugar de un NLRT. En un enfoque, tras la detección con el reactivo de afinidad, se elimina la última base incorporada y su posición se completa con un nucleótido similar, pero con un grupo bloqueador escindible (Koziolkiewicz et al., FEBS Lett. 434:77-82, 1998).

Los ejemplos dados anteriormente incluyen grupos de bloqueo reversibles unidos al nucleótido a través del 3'-O de la unidad estructural de azúcar desoxirribosa. La presente invención también incluye NLRT con grupos de bloqueo reversibles y no reversibles unidos al 2'-O- del azúcar desoxirribosa. Se pueden usar estas realizaciones para la detección de una sola base (extensión del cebador de una sola base o de unas pocas), monitorizando las brechas y las mellas en el ADN y otros métodos de detección. Por lo tanto, un experto en la técnica podrá aplicar los métodos y la información del presente documento a NLRT con grupos de bloqueo 2', en lugar de 3'.

4. Reactivos de afinidad

La presente invención utiliza reactivos de afinidad que se unen específicamente a los NLRT en el extremo 3' de una GDS, por ejemplo, después de la incorporación por una polimerasa al extremo de una cadena de ADN en crecimiento durante SBS. En una realización, se une el reactivo de afinidad a un NLRT de Estructura III. En una realización, se une el reactivo de afinidad a un NLRT de Estructura IV.

4.1 Reactivos de afinidad en general

En un aspecto, la invención se refiere a reactivos de afinidad usados para detectar la presencia o ausencia de un NLRT incorporado en el extremo 3' de un ácido nucleico. Un reactivo de afinidad es una molécula o macromolécula que se une específicamente a un NLRT con base en una característica estructural del NLRT incorporado. Por ejemplo, se puede unir un reactivo de afinidad específicamente a un NLRT que tenga, por ejemplo, una base particular y/o un grupo de bloqueo reversible particular. A modo de ilustración, un ejemplo

de un reactivo de afinidad es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une con alta afinidad a un NLRT incorporado en el extremo 3' de una cadena de ADN cuando el NLRT comprende la nucleobase adenosina y un grupo de bloqueo reversible azidometilo pero no se une con alta afinidad a un NLRT incorporado en el extremo 3' de una cadena de ADN cuando el NLRT comprende la nucleobase adenosina pero tiene un grupo hidroxilo 3' en lugar de un bloqueador reversible azidometilo, y no se une con alta afinidad a un NLRT incorporado en el extremo 3' de una cadena de ADN que comprende la nucleobase citosina, guanina o timina, cada una con o sin un grupo bloqueador reversible azidometilo. Se pueden marcar los reactivos de afinidad directa o indirectamente.

"Especificidad" es el grado en que el reactivo de afinidad discrimina entre diferentes moléculas (por ejemplo, NLRT) según se mide, por ejemplo, mediante afinidades de unión relativas del reactivo de afinidad por las moléculas. Con respecto a los reactivos de afinidad de la presente invención, un reactivo de afinidad debe tener una afinidad sustancialmente mayor por un NLRT (su RT objetivo) que por otros NLRT (por ejemplo, el reactivo de afinidad se une a un análogo de nucleósido C, pero no a, T o G). Además, el reactivo de afinidad se une a su análogo de nucleósido objetivo al final de un polinucleótido cuando se incorpora mediante una polimerasa en el extremo 3' de una cadena de ADN en crecimiento, pero no a una base de nucleótido en otra parte de la cadena de ADN. Un reactivo de afinidad es específico para un NLRT particular, tal como NLRT-A, si en presencia de una pluralidad (por ejemplo, una matriz) de polinucleótidos de plantilla están presentes en los que los terminales 3' de GDS incluyen NLRT-A, NLRT-T, NLRT-C, NLRT-G (por ejemplo, en una matriz), el reactivo de afinidad se une preferentemente a NLRT-A bajo las condiciones de reacción utilizadas en la secuenciación SBS. Como se usa en el presente documento, "unión preferencial" de un agente de afinidad a una primera estructura en comparación con una segunda estructura significa que el agente de afinidad se une a la primera estructura, pero no se une a la segunda estructura o se une a la segunda estructura con menos fuerza (es decir, con una menor afinidad) o menos eficientemente.

En el contexto de la unión de un reactivo de afinidad a un NLRT incorporado, los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares se refieren a la asociación preferencial de un reactivo de afinidad con un NLRT particular (por ejemplo, NLRT-A que tiene un grupo azido 3'-O) en comparación con un NLRT con una nucleobase diferente (NLRT-T, -C o -G), un grupo bloqueador diferente o ningún grupo bloqueador (por ejemplo, desoxiadenosina con un 3'-OH). La unión específica entre un reactivo de afinidad y el NLRT a veces significa una afinidad de al menos 10^{-6} M^{-1} (es decir, una afinidad que tiene un valor numérico inferior a 10^{-6} M^{-1} medido por la constante de disociación K_d). Se prefieren afinidades superiores a 10^{-8} M^{-1} . Se puede determinar la unión específica se utilizando cualquier ensayo de unión (por ejemplo, unión de anticuerpos) conocido en la técnica, incluyendo transferencia Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo, inmunohistoquímica y detección de reactivo de afinidad marcado con fluorescencia unido a un objetivo NLRT en una reacción de secuenciación. Como se analiza más adelante en el presente documento, se puede determinar la especificidad de la unión mediante ensayos de unión positivos y negativos.

Se puede describir la interacción de unión específica entre un reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo, y un desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado de varias maneras, incluso con referencia a la porción, o unidad estructural, del desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado responsable de la especificidad. Una analogía es útil aquí: Imagínese una proteína con dos dominios, el dominio 1 y el dominio 2. Dos anticuerpos diferentes pueden unirse específicamente a la proteína. Sin embargo, pueden reconocer diferentes epítopos. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a un epítipo en el dominio 1 y el segundo anticuerpo puede unirse a un epítipo en el dominio 2. En este caso hipotético, si se realizan modificaciones en el dominio 1, esto puede afectar la unión de la proteína por el primer anticuerpo, sin cambiar la unión por el segundo anticuerpo. En este caso, se puede decir que la unión de la proteína por parte del primer anticuerpo es "dependiente de" el dominio 1, lo que significa que un cambio en el dominio 1 (por ejemplo, un cambio en la secuencia de aminoácidos) cambiará las propiedades de unión del anticuerpo 1 (por ejemplo, eliminar la unión, aumentar la afinidad de unión, reducir la afinidad de unión, etc.). De manera equivalente, se puede decir que el dominio 1 es "responsable de" la unión del anticuerpo 1. En el caso de un desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado, la especificidad de la unión puede deberse a una característica estructural de una unidad estructural (por ejemplo, el grupo de bloqueo) y no verse afectada por la estructura de otras fracciones (por ejemplo, la nucleobase) por otras fracciones. Alternativamente, la especificidad de la unión puede deberse a características estructurales de múltiples fracciones (por ejemplo, tanto la nucleobase como el grupo de bloqueo), etc. Cuando la unión de un reactivo de afinidad a un desoxirribonucleótido terminador reversible incorporado requiere la presencia de características estructurales particulares de una unidad estructural, la unión por el reactivo de afinidad puede "ser específica para" o "basarse en" la presencia o ausencia de una unidad estructural con esas características estructurales. De manera equivalente, la unidad estructural con esas características estructurales puede ser "responsable" de la unión por el reactivo de afinidad, o la unión del reactivo de afinidad puede ser "dependiente" de la presencia de una unidad estructural con esas características estructurales.

También se debe tener en cuenta que la "especificidad" puede depender del entorno. Por ejemplo, imagínese un reactivo de afinidad que se une tanto a A como a A', pero que no se une a B, C o D. En una reacción o muestra que contiene A, A', B y C, el reactivo de afinidad puede unirse tanto a A como a A', y por lo tanto no se puede considerar que "se une específicamente" a A. Sin embargo, en una reacción o muestra que contiene

A, B, C y D, el reactivo de afinidad se uniría solo a A, y en ese entorno se diría que se une específicamente a A. En otro ejemplo, en una muestra que contiene A, A', B y C, el reactivo de afinidad puede unir A y A' con diferentes afinidades o eficiencias, de modo que la unión a A y la unión a A' podrían distinguirse en esas bases

Otro término relacionado es "discriminar" (o a veces "distinguir"). Se puede decir que un reactivo de afinidad que se une a los desoxirribonucleótidos terminadores reversibles incorporados solo si está presente un grupo bloqueador particular (por ejemplo, azidometilo), pero se une a los desoxirribonucleótidos terminadores reversibles incorporados con grupos bloqueadores azidometilo sin tener en cuenta qué nucleobase está presente, se puede decir que "discrimina" entre los desoxirribonucleótidos terminadores reversibles incorporados con y sin un grupo bloqueador azidometilo o, más ampliamente, se puede decir que "discrimina con base en el grupo de bloqueo".

La especificidad de un reactivo de afinidad es el resultado del proceso utilizado para fabricar el reactivo de afinidad. Por ejemplo, un reactivo que reconoce una unidad estructural de bloqueo de azidometilo puede probarse empíricamente con ensayos de unión positivos y negativos. Por ejemplo, en un enfoque, el reactivo es un anticuerpo que se une a un NLRT con base en la presencia de una unidad estructural de bloqueo de O-azidometilo. En un enfoque, se generan anticuerpos contra el hapteno O-azidometilo utilizando azidometilo conjugado con hemocianina de lapa ojo de cerradura. Se puede seleccionar el anticuerpo deseado para unirse a 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina, pero no unirse a otros nucleótidos de desoxiguanina tales como 3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxiguanina; 3'-O-(2-nitrobencil)-2'-desoxiguanina; y 3'-O-alil-2'-desoxiguanina; y contra la unión de otros NLRT de azidometilo tales como 3'-O-azidometil-2'-desoxiadenosina; 3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina; y 3'-O-azidometil-2'-desoxitimina.

También se puede determinar la naturaleza de las interacciones anticuerpo-hapteno utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Al Qaraghuli, 2015, "Defining the complementarities between antibodies and haptens to refine our understanding and aid the prediction of a successful binding interaction" BMC Biotechnology, 15(1)p.1; Britta et al., 2005, "Generation of hapten-specific recombinant antibodies: Antibody phage display technology: Una revisión de "Vet Med. 50:231-52; Charlton et al., 2002. "Isolation of anti-hapten specific antibody fragments from combinatorial libraries" Methods Mol Biol. 178:159-71; and Hongtao et al., 2014, "Molecular Modeling Application on Hapten Epitope Prediction: An Enantioselective Immunoassay for Ofloxacin Optical Isomers" J. Agric. Food Chem. 62 (31) pp 7804-7812. Se entenderá que describir un reactivo de afinidad como que se une a ciertas fracciones (por ejemplo, una nucleobase y un resto de azúcar) no excluye la unión a otras partes del nucleótido incorporado. Por ejemplo, también se puede unir un reactivo de afinidad que se une a una nucleobase y un resto de azúcar a un grupo de bloqueo.

Los ejemplos de reactivos de afinidad útiles incluyen anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos y similares), aptámeros, nudos, afimeros, dNTP marcados que forman una triple hélice de una base, proteínas de unión a nucleótidos de guanina (G- proteínas), o cualquier otro agente conocido que se una a un NLRT incorporado con una especificidad y afinidad adecuadas.

El reactivo de afinidad reconoce específicamente la nucleobase basándose en la presencia de un grupo OH 3' libre en el nucleótido terminal 3' o basándose en la presencia de un grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido terminal 3'. En un enfoque, el reactivo de afinidad reconoce un epítipo que comprende el grupo de bloqueo. En otro enfoque, el reactivo de afinidad reconoce un epítipo que comprende la nucleobase. En otro enfoque, el reactivo de afinidad reconoce un epítipo que comprende la nucleobase y el grupo de bloqueo. Se entenderá que incluso si el reactivo de afinidad no entra en contacto con una unidad estructural, la unidad estructural puede dictar la posición de otras fracciones. Por ejemplo, para un reactivo de afinidad que discrimina NLRT con base en la nucleobase y el grupo de bloqueo 3', se requiere la unidad estructural de desoxirribosa para posicionar una nucleobase y el grupo de bloqueo 3' para el reconocimiento.

En el caso de los reactivos de afinidad que son anticuerpos, se puede determinar la unión específica utilizando cualquier ensayo de unión de anticuerpos conocido en la técnica, incluyendo transferencia Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo o cromatografía en columna. En un enfoque, se demuestra la unión específica utilizando un ensayo de tipo ELISA. Por ejemplo, se pueden titular en serie los anticuerpos séricos generados contra 3'-azidometil-dC contra un sustrato unido de 3'-O-azidometil-dC (ensayo de especificidad positiva) y nucleótidos como 3'-O-azidometil-dG o -dA o 3'-OH-dC (ensayo de especificidad negativa).

En algunas realizaciones, la unión específica de base de un reactivo de afinidad por su nucleósido objetivo es 2 a 100 veces mayor que la unión a otros nucleósidos o análogos. En algunas realizaciones, la unión específica de base de un reactivo de afinidad por su nucleósido objetivo es al menos 10 veces mayor que la unión a otros nucleósidos, o al menos 30 veces mayor, o al menos 100 veces mayor.

La eficacia preferida de unión del anticuerpo a la base específica es a la concentración inferior a 100 pM, o inferior a 1 nM, o inferior a 10 nM, o inferior a 1 μM.

Se pueden seleccionar los reactivos de afinidad con la especificidad deseada utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un reactivo de afinidad como un anticuerpo puede identificarse, seleccionarse o purificarse mediante rondas de selección positiva (es decir, se une a la molécula objetivo) y selección negativa (es decir, no se une a moléculas que no sean la molécula objetivo).

- 5 Un reactivo de afinidad puede unirse tanto a un dNTP en solución como al nucleótido correspondiente incorporado en el terminal 3' de un producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad no se une a un NLRT no incorporado (por ejemplo, un NLRT en solución) o se une con una especificidad significativamente menor. Sin embargo, en general, la unión de los NLRT no incorporados por los reactivos de afinidad no ocurre en el proceso de secuenciación porque se eliminan los NLRT no incorporados (lavan) antes de la introducción de los reactivos de afinidad. Como alternativa, se eliminan los complejos formados por reactivos de afinidad unidos a NLRT (lavan) antes de la obtención de imágenes.

- 10 En un enfoque, el reactivo de afinidad se une específicamente a la nucleobase y distingue entre diferentes bases (por ejemplo, A, T, G, C) en parte con base en la presencia o ausencia de un grupo 3'-OH. En este enfoque, el reactivo de afinidad distingue un nucleótido en el extremo 3' de un GDS con un 3'-OH de los nucleótidos incorporados en el interior del GDS (no en el extremo 3'). En algunos casos, el reactivo de afinidad que reconoce una nucleobase específica también distingue entre la presencia o ausencia de grupos 3'-OH, reconociendo así un NLRT incorporado como un nucleótido terminal 3' con una nucleobase particular.

- 15 En un enfoque, el reactivo de afinidad reconoce un epítipo que comprende el grupo de bloqueo, pero no distingue entre bases. Por ejemplo, dados cuatro grupos de bloqueo de RT [A. azidometilo, B. 2-(cianoetoxi)metilo, C. 3'-O-(2-nitrobencilo) y D. 3'-O-alilo] se pueden producir reactivos de afinidad que distinguen los cuatro grupos de bloqueo. A modo de ilustración, dados los análogos de desoxiguanina marcados de la A a la D a continuación, se puede seleccionar un reactivo de afinidad que reconozca solo un NLRT, pero no los otros tres.

- A. 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina
25 B. 3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxiguanina
C. 3'-O-(2-nitrobencil)-2'-desoxiguanina
D. 3'-O-alil-2'-desoxiguanina

- 30 En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad seleccionado no distingue entre nucleótidos con diferentes nucleobases siempre que compartan el mismo grupo de bloqueo. Por ejemplo, un reactivo de afinidad que reconoce B (3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxiguanina), anterior, también puede reconocer 3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxiadenina; 3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxitimina; y 3'-O-2-(cianoetoxi)metil-2'-desoxicitosina.

- 35 La generación de reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que reconozcan diferencialmente los grupos de bloqueo de RT está dentro de la experiencia de un experto en la técnica guiado por esta divulgación. En un enfoque, se genera un anticuerpo contra el hapteno O-azidometilo (por ejemplo, -O-azidometilo o azidometilo conjugado con hemocianina de lapa ojo de cerradura) y se examina positiva y negativamente para unirse a un nucleótido 3'-O-azidometil-2'-dNM en el extremo 3' de un GDS TP (donde N es cada uno de A, T, G o C) y por no unirse a 3'-O-X-2'-dNM donde O-X es un grupo de bloqueo diferente presente en la reacción de secuenciación. Se reconocerá que, en otras realizaciones, el hapteno puede ser desoxirribosa con el grupo de bloqueo 3'-O, un nucleótido (por ejemplo, monofosfato o trifosfato con un grupo de bloqueo 3'-O) o similares, siempre que el proceso de selección identificó reactivos de afinidad con la especificidad deseada.

- 45 Aunque el ejemplo anterior describió una realización en la que los cuatro nucleótidos tenían diferentes grupos de bloqueo con diferencias estructurales muy distintas (por ejemplo, azidometilo frente a 2-(cianoetoxi)metilo), en algunas realizaciones de la presente invención solo hay pequeñas diferencias entre los grupos de bloqueo unidos por reactivos de afinidad distintos. Por ejemplo, en un grupo de bloqueo, se puede reemplazar un átomo de hidrógeno por un átomo de flúor o un grupo metilo para generar tres grupos de bloqueo relacionados [grupo de bloqueo, grupo de bloqueo sustituido con F, grupo de bloqueo sustituido con metilo] que pueden distinguirse por un conjunto de reactivos de afinidad.

- 50 En algunas realizaciones de la invención, se lleva a cabo la secuenciación utilizando cuatro NLRT, cada uno de los cuales tiene un grupo de bloqueo 3'-O en el que los grupos de bloqueo de 2 o más, alternativamente 3 o más, alternativamente los 4 son estructuralmente similares en el sentido de que (1) tienen el mismo número de átomos o el número de átomos difiere en no más de un pequeño número (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10); (2) las fórmulas moleculares de las fracciones del grupo de bloqueo difieren entre 1 y 10 átomos (por ejemplo, H solo reemplazado por CH₃ son 3 diferencias; H reemplazado por F, O reemplazado por S), por ejemplo, 1 átomo, 2 átomos, 3 átomos, 4 átomos, 6 átomos, 7 átomos, 8 átomos, 9 átomos o 10 átomos. En estas y otras realizaciones, la unidad estructural del grupo de bloqueo puede tener cualquiera de las

propiedades descritas anteriormente en la sección titulada "Properties of Reversible Terminator Blocking Groups and Nucleotides Containing Them."

En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad se une a un NLRT (por ejemplo, 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina) pero no se une al nucleótido desbloqueado correspondiente (por ejemplo, 3'-OH-2'-desoxiguanina).

En una realización, el reactivo de afinidad se une a un NLRT (por ejemplo, 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina) pero se disocia del análogo de nucleótido después del tratamiento para eliminar el grupo de bloqueo (por ejemplo, después del tratamiento con TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina)).

Un reactivo de afinidad que reconoce específicamente NLRT-A se denomina anti-A. Un reactivo de afinidad que reconoce específicamente NLRT-T se denomina anti-T. Un reactivo de afinidad que reconoce específicamente NLRT-G se denomina anti-G. Un reactivo de afinidad que reconoce específicamente NLRT-C se denomina anti-C. Un reactivo de afinidad que reconoce específicamente NLRT-U se denomina anti-U. Aunque esta nomenclatura es similar a la utilizada para describir la especificidad de las inmunoglobulinas, el uso de esta terminología en la presente invención no pretende indicar que el reactivo de afinidad sea necesariamente un anticuerpo. Como se ha indicado,

Se pueden marcar directamente los reactivos de afinidad. Alternativamente, los reactivos de afinidad pueden ser un reactivo de afinidad primario sin marcación detectable usando un reactivo de afinidad secundario marcado. Por ejemplo, se puede detectar un reactivo de afinidad primaria sin marcación que se une específicamente a un NLRT con un reactivo de afinidad secundaria marcado que se une al reactivo de afinidad primaria (por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une al reactivo de afinidad primaria). Véase la Sección 4.5, a continuación.

4.2 Reactivos de afinidad ejemplares

En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad es un anticuerpo. Puede emplearse cualquier método para la producción de anticuerpos que sea conocido en la técnica.

4.2.1 Anticuerpos

Como se usa en el presente, "anticuerpo" significa una molécula o composición de inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales), así como formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producido en animales, incluyendo, entre otros, animales transgénicos. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye "fragmentos de anticuerpo", incluyendo, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, nanocuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Se pueden fragmentar los anticuerpos usando técnicas convencionales. Por ejemplo, F(ab')₂ se pueden generar los fragmentos tratando un anticuerpo con pepsina. Se puede tratar fragmento F(ab')₂ resultante para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. También se puede sintetizar Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos mediante técnicas recombinantes. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo útil, incluyendo IgM e IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, los reactivos de afinidad son minicuerpos. Los minicuerpos son constructos de anticuerpos modificados genéticamente compuestos por los dominios de cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL) de un anticuerpo nativo fusionado con la región bisagra y con el dominio CH3 de la molécula de inmunoglobulina. Los minicuerpos son, por lo tanto, versiones pequeñas de anticuerpos completos codificados en una sola cadena de proteína que retienen la región de unión al antígeno, el dominio CH3 para permitir el ensamblaje en una molécula bivalente y la bisagra del anticuerpo para acomodar la dimerización por enlaces disulfuro. También se puede usar un anticuerpo de un solo dominio (sdAb). Un anticuerpo de dominio único, o NANOBODY (Ablynx), es aproximadamente un fragmento de anticuerpo con un único dominio de anticuerpo monomérico variable. Los anticuerpos de un solo dominio se unen selectivamente a antígenos específicos y son más pequeños (MW 12-15 kDa) que los anticuerpos convencionales.

4.2.1.1 Producción de anticuerpos

Se conocen métodos para producir anticuerpos policlonales y se pueden usar para producir anticuerpos específicos de NLRT. Para un enfoque, véase el Ejemplo 2 a continuación. De acuerdo con un método para generar anticuerpos policlonales específicos para un NLRT particular, por ejemplo, NLRT-A, se inyecta un conejo con NLRT-A (conjugado con un inmunógeno) para generar anticuerpos, y se seleccionan los anticuerpos para que no se unan a: la misma estructura que carece del grupo de bloqueo (por ejemplo, que tiene un 3'-OH) y los otros NLRT (NLRT-T, NLRT-G y NLRT-C). Por lo tanto, los anticuerpos policlonales producidos reconocen el NLRT específico que se incorpora en el extremo 3' de una cadena de ADN en crecimiento en una posición particular en una matriz de secuenciación, pero no ese mismo nucleósido en otras posiciones interiores de la

cadena en crecimiento o a otros NLRT que puede incorporarse en cualquier otro lugar de la matriz. (Los anticuerpos policlonales también pueden reconocer NLRT-A no incorporados, pero se eliminan los NLRT no incorporados por lavado antes de que los NLRT incorporados se prueben con reactivos de afinidad marcados.

Se reconocerá que, según las necesidades del investigador, no siempre es necesario generar anticuerpos contra el NLRT completo. Por ejemplo, si se desean anticuerpos específicos para el grupo de bloqueo, el hapteno puede ser desoxirribosa con un grupo de bloqueo 3'-O (es decir, sin nucleobase) o el grupo de bloqueo 3'-O solo. En algunas realizaciones, se generan anticuerpos contra un polinucleótido con un NLRT de interés en el extremo 3'. En algunas realizaciones, se generan anticuerpos contra un polinucleótido hibridado con una molécula plantilla.

Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden recolectar las células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado con un inmunógeno que comprende un NLRT y se fusionan con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas, inmortalizando así estas células y produciendo células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Kohler and Milstein *Nature* 256:495-497, 1975) así como otras técnicas como la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunol. Today* 4:72), la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1986, *Methods Enzymol.* 121:140-67) y cribado de bibliotecas de anticuerpos combinatorios (Huse et al., 1989, *Science* 246:1275). Se pueden cribar las células de hibridoma inmuoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con una RT particular y se pueden aislar los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra antígenos o moléculas particulares, también pueden generarse examinando bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, expresados en bacterias con componentes de la superficie celular. Por ejemplo, se pueden expresar los fragmentos Fab completos, las regiones VH y las regiones FV en bacterias usando bibliotecas de expresión de fagos (véase por ejemplo Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989; Huse et al. *Science* 246:1275, 1989; y McCafferty et al. *Nature* 348:552-554, 1990).

Además, los anticuerpos específicos para un NLRT objetivo se aíslan fácilmente mediante el cribado de bibliotecas de expresión de fagos de anticuerpos. Por ejemplo, se selecciona una biblioteca de fagos de anticuerpos opcionalmente para identificar fragmentos de anticuerpos específicos para un NLRT objetivo. Los métodos para cribar bibliotecas de fagos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

También se pueden producir los anticuerpos anti-NLRT en un sistema libre de células. Se describen los sistemas sin células ejemplares no limitantes, por ejemplo, en Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44, 2009; Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45, 2004; y Endo y col., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713, 2003.

4.2.1.2 Purificación de anticuerpos

Se pueden purificar los anticuerpos anti-NLRT mediante cualquier método adecuado. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de matrices de afinidad o cromatografía de interacción hidrofóbica. También puede ser adecuada la cromatografía interactiva hidrofóbica, por ejemplo, una columna de butilo o fenilo, para purificar algunos polipéptidos. Véase la Sección 8.4, a continuación. En la técnica se conocen muchos métodos de purificación de polipéptidos. Se describe la purificación por afinidad de anticuerpos anti-NLRT a partir de un antisuero policlonal en el Ejemplo 2 a continuación.

4.2.1.3 Marcado de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden marcar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para unir anticuerpos y otros reactivos de afinidad a moléculas indicadoras, por ejemplo, proteínas generadoras de señales, incluyendo enzimas y proteínas fluorescentes/luminiscentes, son bien conocidos en la técnica (Wild, *The Immunoassay Handbook*, 4th ed.; Elsevier: Ámsterdam, Países Bajos, 2013; Kobayashi y Oyama, *Analyst* 136:642-651, 2011).

4.2.2 Aptámeros

Un aptámero es una molécula de oligonucleótido o péptido que se une a una molécula objetivo específica. Los aptámeros se pueden clasificar en: (a) aptámeros de ADN o ARN o XNA, que consisten en cadenas (generalmente cortas) de oligonucleótidos; y (b) aptámeros peptídicos, que consisten en uno (o más) dominios peptídicos variables cortos, unidos en ambos extremos a un andamiaje proteico.

Los aptámeros de ácidos nucleicos son especies de ácidos nucleicos que se han diseñado a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o, de manera equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a diversos objetivos moleculares, por ejemplo, NLRT. Por ejemplo, se pueden seleccionar los aptámeros con afinidad por un NLRT objetivo de una gran biblioteca de oligonucleótidos a través de SELEX, un proceso iterativo en el que se descartan los aptámeros que no se unen y se expanden los aptámeros que se unen al objetivo propuesto. Las rondas iniciales de selección positiva a

veces van seguidas de una selección negativa. Esto mejora la selectividad de los candidatos aptámeros resultantes. En este proceso, se inmoviliza el NLRT objetivo en una columna de afinidad. Se aplica la biblioteca de aptámeros y se permite que se una. Se eliminan por lavado los aglutinantes débiles por lavado y se eluden los aptámeros unidos y se amplifican mediante PCR. Luego, se vuelve a aplicar el grupo de aptámeros amplificados a los objetivos. Se repite varias veces el proceso con una rigurosidad creciente hasta que se obtienen los aptámeros de la selectividad y afinidad deseadas. Véase, por ejemplo, Jayasena, et al., *Clinical Chemistry* 45:1628-1650, 1999. Se puede realizar la selección de aptámeros de péptidos utilizando diferentes sistemas, incluyendo el sistema de dos híbridos de levadura. También se pueden seleccionar los aptámeros de péptidos de bibliotecas de péptidos combinatorias construidas mediante presentación de fagos y otras tecnologías de presentación en superficie tales como presentación de ARNm, presentación en ribosomas, presentación en bacterias y presentación en levaduras. Estos procedimientos experimentales también se conocen como *biopannings*. Véase, por ejemplo, Reverdatto et al., 2015, *Curr. Top. Med. Chem.* 15:1082-1101.

4.2.3 Afimeros

Los afimeros son proteínas pequeñas (12-14 kDa) altamente estables que se unen a sus moléculas objetivo con especificidad y afinidad similares a las de los anticuerpos. Estas proteínas comparten la estructura terciaria común de una hélice alfa situada encima de una lámina beta antiparalela. Las proteínas afimeras muestran dos bucles peptídicos y una secuencia N-terminal que pueden aleatorizarse para unirse a las proteínas objetivo deseadas con alta afinidad y especificidad de manera similar a los anticuerpos monoclonales. La estabilización de los dos péptidos por el andamio de proteínas restringe las posibles conformaciones que pueden tomar los péptidos, aumentando la afinidad de unión y la especificidad en comparación con las bibliotecas de péptidos libres.

Se pueden seleccionar los afimeros específicos para un NLRT mediante el uso de bibliotecas de presentación de fagos que se analizan para identificar una proteína de afimero con unión de alta especificidad al NLRT objetivo y afinidades de unión altas (por ejemplo, en el intervalo de nM). Se han conjugado muchos marcadores, marcadores y proteínas de fusión diferentes, tales como fluoróforos, con proteínas de afimero para su uso en diversas aplicaciones. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. No. 8,481,491, US Unidos 8,063,019, y el documento WO 2009/136182. Véase también Crawford y col., *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 2:72-79, 2003.

4.2.4 Nudos

"Nudo" o "nudo de cistina inhibidor" (ICK) es un motivo estructural de proteína que contiene tres puentes disulfuro. Junto con las secciones de polipéptido entre ellos, dos disulfuros forman un bucle a través del cual pasa el tercer enlace disulfuro (que une la tercera y la sexta cisteína en la secuencia), formando un nudo. Se pueden introducir nuevos epítomos de unión en los nudos naturales utilizando la ingeniería de proteínas, y se han diseñado los nudos para dirigirse a una amplia gama de objetivos. Un enfoque para la producción de nudos que son específicos para los NLRT es crear y cribar bibliotecas de nudos utilizando la visualización de la superficie de la levadura y la clasificación de células activadas por fluorescencia. Para obtener información sobre la producción de nudos con selectividad y alta afinidad por un NLRT objetivo y la marcación de dichos nudos para su uso en relación con la presente invención, véase, por ejemplo, Kintzing y Cochran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34:143-150, 2016; Moore et al., *Drug Discovery Today: Technologies* 9(1):e3-e11, 2012; y Moore y Cochran, *Meth. Enzymol.* 503:223-51, 2012.

4.3 Reactivos de afinidad marcados

Se pueden usar los reactivos de afinidad marcados para secuenciar un ácido nucleico plantilla mediante una variedad de métodos. También se pueden usar en una variedad de aplicaciones distintas de la secuenciación, como será evidente para los expertos en la técnica. Puede usarse cualquier método de marcaje de anticuerpos y otros reactivos de afinidad de la invención.

4.3.1 Marcadores detectables fluorescentes

Se pueden marcar de manera detectable los reactivos de afinidad utilizados en la práctica de la invención, incluyendo anticuerpos, aptámeros, afimeros, nudos y otros reactivos de afinidad descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden marcar de manera detectable los reactivos de afinidad descritos en el presente documento con tintes fluorescentes o fluoróforos. "Tinte fluorescente" significa un fluoróforo (un compuesto químico que absorbe energía luminosa de una longitud de onda específica y vuelve a emitir luz a una longitud de onda más larga). Los tintes fluorescentes normalmente tienen un coeficiente de extinción molar máximo a una longitud de onda entre aproximadamente 300 nm y aproximadamente 1000 nm o de al menos aproximadamente 5000, más preferiblemente al menos aproximadamente 10,000 y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 50,000 cm⁻¹ M⁻¹, y un rendimiento cuántico de al menos aproximadamente 0,05, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,5 y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.

Hay una gran cantidad de orientación práctica disponible en la literatura para seleccionar marcadores detectables apropiados para unirlos a un reactivo de afinidad, como se ejemplifica en las siguientes referencias:

Grimm y col., Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 113:1-34, 2013; Oushiki et al., Anal. Chem. 84:4404-4410, 2012; Medintz & Hildebrandt, editors, 2013, "FRET - Förster Resonance Energy Transfer: from theory to applications," (John Wiley & Sons); y similares. La literatura también incluye referencias que proporcionan listas de moléculas fluorescentes y sus propiedades ópticas relevantes para elegir fluoróforos o parejas reportero-inhibidor, por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 2005); y similares. Además, existe una amplia guía en la literatura para derivatizar moléculas indicadoras para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes que se pueden agregar a un RT o una porción del mismo, como se ejemplifica en: Ullman et al., Patente de EE. UU. No. 3,996,345; Khanna et al., Patente de EE. UU. No. 4,351,760; y similares.

Los tintes fluorescentes ejemplares incluyen, sin limitación, tintes de acridina, tintes de cianina, tintes de fluorona, tintes de oxazina, tintes de fenantridina y tintes de rodamina. Los tintes fluorescentes ejemplares incluyen, sin limitación, fluoresceína, FITC, Texas Red, ROX, Cy3, un tinte Alexa Fluor (por ejemplo, Alexa Fluor 647 o 488), un tinte ATTO (por ejemplo, ATTO 532 o 655) y Cy5. Los tintes fluorescentes ejemplares pueden incluir además tintes que se usan en, o son compatibles con, procesos químicos y flujos de trabajo de SBS de dos o cuatro canales.

Se pueden seleccionar las moléculas marcadoras ejemplares de tintes de xanteno, incluyendo fluoresceínas y tintes de rodamina. Muchas formas adecuadas de estos compuestos están ampliamente disponibles comercialmente con sustituyentes en sus fracciones de fenilo que pueden usarse como sitio para enlazar con un reactivo de afinidad. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en posición alfa o beta. Incluyendo entre tales compuestos de naftilamino están 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalenosulfonato y 2-p-toluidinil-6-naftalenosulfonato. Otras marcadores incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina; acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles; estilbenos; pirenos; y similares.

En algunas realizaciones, se seleccionan los marcadores de tintes de fluoresceína y rodamina. Se describen estos tintes y las metodologías de enlace apropiadas en muchas referencias, por ejemplo, Khanna *et al.* (antes citada); Marshall, Histochemical J., 7:299-303 (1975); Menchen et al., Patente de EE. UU. No. 5,188,934; Menchen et al., Solicitud de Patente Europea No. 87310256.0; y Bergot et al., Solicitud Internacional PCT/US90/05565. Los fluoróforos que se pueden usar como marcadores detectables para reactivos de afinidad o análogos de nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, rodamina, cianina 3 (Cy 3), cianina 5 (Cy 5), fluoresceína, Vic™, Liz™, Tamra™, 5-Familia™, 6-Familia™, 6-HEX, CAL Fluor Green 520, CAL Fluor Gold 540, CAL Fluor Orange 560, CAL Fluor Red 590, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor Red 615, CAL Fluor Red 635 y Texas Red (Molecular Probes).

Mediante una elección juiciosa de los marcadores, se pueden realizar análisis en los que los diferentes marcadores se excitan y/o detectan a diferentes longitudes de onda en una sola reacción. Véase, por ejemplo, Fluorescence Spectroscopy (Pesce et al., Eds.) Marcel Dekker, Nueva York, (1971)); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker, New York, (1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd ed., Academic Press, Nueva York, (1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, Nueva York, (1976); Indicators (Bishop, Ed.). Pergamon Press, Oxford, 1972; y Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Eugene (2005).

4.3.2 Reactivos de afinidad marcados enzimáticamente

En un enfoque, se marca enzimáticamente el reactivo de afinidad (por ejemplo, anticuerpo o afímero) y, en presencia de sustrato, la enzima asociada con un reactivo de afinidad unido a un producto de extensión del cebador produce una señal detectable. Por ejemplo y sin limitación, las enzimas incluyen peroxidasa, fosfatasa, luciferasa, etc. En un enfoque, la enzima es una peroxidasa. En un enfoque, se marca directamente enzimáticamente el reactivo de afinidad (por ejemplo, anticuerpo o afímero). En un enfoque, por ejemplo, se marca un anticuerpo u otro reactivo de afinidad usando peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP) o una fosfatasa, tal como una fosfatasa alcalin. (Beyzavi et al., Annals Clin Biochem 24:145-152, 1987). En un enfoque, el reactivo de afinidad se acopla a (o es parte de una proteína de fusión con) luciferasa u otra proteína que puede usarse para producir una señal quimioluminiscente. En otro enfoque, el reactivo de afinidad se puede acoplar/fusionar con un sistema enzimático que se selecciona para producir una señal no óptica, tal como un cambio en el pH donde se pueden detectar protones, por ejemplo, mediante secuenciación de semiconductores de iones (por ejemplo, secuenciadores Ion Torrent; Life Technologies Corporation, Grand Island, NY). El uso de reactivos de afinidad marcados con enzimas tiene ciertas ventajas, incluyendo la alta sensibilidad resultante de la amplificación de la señal y la capacidad de adaptar el método de secuenciación a una variedad de instrumentos. Los sistemas de indicadores enzimáticos se revisan en Rashidian y col., Bioconjugate Chem. 24:1277-1294, 2013.

4.3.3 Reactivos de afinidad de fusión de anticuerpos

Además, se pueden usar las fusiones que unen directamente fragmentos de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, fragmentos Fv monocatenarios (scFvs) con proteínas indicadoras (Skerra y Plückthun, Science 240:1038-1041, 1988; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Huston et al., Methods Enzymol 203:46-88, 1991; Ahmad et al., Clin. Dev. Immunol. 2012:1, 2012). Por ejemplo, se pueden usar las fotoproteínas con propiedades bioluminiscentes, por ejemplo, luciferasas y aequorina, como proteínas indicadoras en proteínas de fusión con fragmentos de anticuerpos, péptidos epitópicos y estreptavidina, por ejemplo (Oyama et al., Anal Chem 87:12387-12395, 2015; Wang et al., Anal Chim Acta 435:255-263, 2001; Desai et al., Anal Biochem 294:132-140, 2001; Inouye et al., Biosci Biotechnol Biochem 75:568-571, 2011).

4.4 Métodos de detección indirecta y directa

Un reactivo de afinidad se puede marcar directamente (por ejemplo, mediante conjugación con el marcador, por ejemplo, a través de un enlace covalente, con un fluoróforo) o indirectamente, por ejemplo, mediante la unión de un reactivo de afinidad secundaria marcado que se une a un reactivo de afinidad primaria directamente unido al cebador extendido con un 3' NLRT. Los reactivos de afinidad primaria sin marcación se unen al nucleótido objetivo y los reactivos de afinidad secundaria marcados (por ejemplo, anticuerpos, aptámeros, afimeros o nudos) se unen a los reactivos de afinidad primaria. En algunos enfoques, el reactivo de afinidad primario y/o secundario es un anticuerpo. Por ejemplo, en un enfoque, el reactivo de afinidad es un anticuerpo "primario" (por ejemplo, anticuerpo anti-NLRT-C de conejo) y el aglutinante secundario es un anticuerpo anti-primario marcado (por ejemplo, anticuerpo anti-conejo de cabra marcado con tinte). En algunos enfoques, el uso de un reactivo de afinidad secundaria proporciona una amplificación de señal ventajosa.

En el caso de la detección indirecta, el ensayo consiste en dos partes distintas: primero, hay un período de incubación (generalmente una hora) con el anticuerpo primario sin marcación, durante el cual el anticuerpo se une al antígeno (suponiendo, por supuesto, que el antígeno está presente). A continuación, se elimina por lavado el exceso de anticuerpo primario no unido y se añade un reactivo secundario marcado. Después de un período de incubación (nuevamente una hora), se elimina por lavado el exceso de reactivo secundario y se cuantifica la cantidad de marcador asociado con el anticuerpo primario (es decir, indirectamente a través del reactivo secundario). La marca generalmente da como resultado la producción de una sustancia coloreada o un aumento en la cantidad de luz emitida en una cierta longitud de onda, si el antígeno está presente. En ausencia de antígeno, no hay unión del anticuerpo primario ni unión del reactivo secundario y, por lo tanto, no hay señal. Con la detección directa, la unión covalente previa del marcador al anticuerpo primario significa que solo se requiere un único paso de incubación con el antígeno y solo una única ronda de pasos de lavado, a diferencia de dos rondas de incubación y lavado con detección indirecta.

4.4.1 Especificidad del anticuerpo secundario

Se pueden seleccionar los anticuerpos primarios y secundarios para distinguir múltiples antígenos (por ejemplo, para distinguir RT-A, RT-C, RT-G y RT-T entre sí). Los anticuerpos primarios sin marcación (normalmente anticuerpos monoclonales o modificados) pueden tener diferentes isotipos y/o tener secuencias características de diferentes especies (por ejemplo, anticuerpos policlonales generados en diferentes animales o anticuerpos monoclonales correspondientes u otros reactivos de afinidad). En tales casos, los anticuerpos secundarios marcados (es decir, anti-primarios) para cada antígeno deben ser específicos para el isotipo o secuencia de especies apropiados. Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos primarios de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 con anticuerpos secundarios específicos de isotipo.

4.4.2 Anticuerpos primarios y secundarios precombinados

Pueden añadirse anticuerpos primarios y secundarios u otros agentes a una matriz de secuenciación de forma secuencial, simultánea, pueden precombinarse bajo condiciones en las que los anticuerpos secundarios se unen al anticuerpo primario y se añaden a la matriz como un complejo. Véase la Figura 2 y el Ejemplo 7.

4.5 Secuenciación de uno, dos, tres o cuatro colores

La secuenciación usando métodos de la invención puede ser una secuenciación de dos, tres o cuatro colores. En un enfoque (secuenciación de cuatro colores), se marca directa o indirectamente cada reactivo de afinidad con un marca detectable diferente (por ejemplo, un tinte fluorescente) o una combinación de marcadores que producen una señal única. Se apreciará que cuando se reconoce un único antígeno con dos o más tintes (u otros marcadores) es posible, pero no necesario, marcar una sola molécula de reactivo de afinidad con ambos (o todos) los tintes u otros marcadores. Más bien, se puede marcar una porción (por ejemplo, 50 %) de las moléculas del reactivo de afinidad específico para el antígeno único con un tinte y se puede marcar otra porción (por ejemplo, 50 %) de las moléculas del reactivo de afinidad específico para el antígeno único con el otro tinte.

De acuerdo con uno de tales métodos, se proporciona una matriz que comprende plantillas de ácido nucleico monocatenario dispuestos en posiciones sobre una superficie. Se realiza la secuenciación por extensión, o SBS, para determinar la identidad de los nucleótidos en las posiciones de detección en las plantillas de ácido nucleico en múltiples ciclos de secuenciación mediante: (i) unir (o incorporar) un nucleótido complementario sin marcación (NLRT) a un nucleótido en una posición de detección, (ii) marcar el NLRT uniéndolo a un reactivo

de afinidad marcado directa o indirectamente que se une específicamente a tal NLRT; (iii) detectar la presencia o ausencia de señales asociadas con el NLRT complementario en la posición de detección, la señal resultante del marcador (por ejemplo, una señal fluorescente); en el que (1) detectar una primera señal y no una segunda señal en la posición de detección identifica el NLRT complementario seleccionado de NLRT-A, NLRT-T, NLRT-G y NLRT-C; (2) detectar la segunda señal y no la primera señal en la posición de detección identifica el NLRT complementario como un NLRT seleccionado de NLRT-A, NLRT-T, NLRT-G o NLRT-C que es diferente del NLRT seleccionado en (1); (3) detectar tanto la primera señal como la segunda señal en la posición de detección identifica el NLRT complementario como un NLRT seleccionado de NLRT-A, NLRT-T, NLRT-G y NLRT-C que es diferente de los nucleótidos seleccionados en (1) y (2); y (4) no detectar ni la primera señal ni la segunda señal en la posición identifica el NLRT complementario como un NLRT seleccionado de NLRT-A, NLRT-T, NLRT-G y NLRT-C que es diferente de los nucleótidos seleccionados en (1), (2) y (3); y (iii) deducir la identidad del nucleótido en la posición de detección en la plantilla de ácido nucleico basándose en la identidad del NLRT complementario.

Otro método de este tipo comprende: proporcionar una pluralidad de plantillas de ácido nucleico, cada una de las cuales comprende un sitio de unión al cebador y, junto al sitio de unión al cebador, una secuencia de ácido nucleico objetivo; realizar reacciones de secuenciación en la pluralidad de diferentes plantillas de ácido nucleico hibridando un cebador con el sitio de unión del cebador y extendiendo los cebadores individuales en un nucleótido por ciclo en uno o más ciclos de secuenciación por síntesis utilizando un conjunto de NLRT y un conjunto correspondiente de reactivos de afinidad, por ejemplo: (i) primeros NLRT y primeros reactivos de afinidad que se unen específicamente a los primeros NLRT y que comprenden un primer marcador; (ii) segundos NLRT y segundos reactivos de afinidad que se unen específicamente a los segundos NLRT y que comprenden un segundo marcador; (iii) terceros NLRT y terceros reactivos de afinidad que se unen específicamente a los terceros NLRT y que comprenden tanto el primer marcador como el segundo marcador; y (iv) cuartos NLRT y cuartos reactivos de afinidad que se unen específicamente a los cuartos NLRT y que no comprenden ni el primer marcador ni el segundo marcador, en el que el primer marcador y el segundo marcador se distinguen entre sí; y en cada ciclo de secuenciación por síntesis, determinar las identidades de los NLRT en las posiciones de detección detectando la presencia o ausencia del primer marcador y la presencia o ausencia del segundo marcador para determinar las secuencias de ácido nucleico objetivo. Una alternativa al método anterior es usar una mezcla de reactivos de tercera afinidad que se unen específicamente a los terceros NLRT, algunos de los cuales comprenden el primer marcador y otros comprenden el segundo marcador (por ejemplo, una mezcla igual).

En un método de secuenciación de un solo color, los reactivos de afinidad incluyen un marcador detectable que está presente en intensidades distinguibles. Por ejemplo, de acuerdo con una de dichas realizaciones, dicho método comprende: proporcionar una pluralidad de plantillas de ácido nucleico, cada una de las cuales comprende un sitio de unión al cebador y, adyacente al sitio de unión al cebador, una secuencia de ácido nucleico diana; realizar reacciones de secuenciación en la pluralidad de diferentes plantillas de ácido nucleico hibridando un cebador con el sitio de unión del cebador y extendiendo los cebadores individuales en un nucleótido por ciclo en uno o más ciclos de secuenciación por síntesis utilizando un conjunto de NLRT y un conjunto correspondiente de reactivos de afinidad, por ejemplo: (i) primeros NLRT y primeros reactivos de afinidad que se unen específicamente a los primeros NLRT y que comprenden un marcador en una primera intensidad; (ii) segundos NLRT y reactivos de segunda afinidad que se unen específicamente a los segundos NLRT y que comprenden el marcador en una segunda intensidad; (iii) terceros NLRT y reactivos de tercera afinidad que se unen específicamente a los terceros NLRT y que comprenden el marcador en una tercera intensidad; y (iv) cuartos NLRT y cuartos reactivos de afinidad que se unen específicamente a los cuartos NLRT y que no están marcados (o, alternativamente, el conjunto de reactivos de afinidad incluye solo el primer, segundo y tercer reactivo de afinidad y no incluye un cuarto reactivo de afinidad que se une al cuarto NLRT); y en cada ciclo de secuenciación por síntesis, determinar las identidades de los NLRT en las posiciones de detección mediante la detección de la presencia e intensidad (o ausencia) del marcador para determinar las secuencias de ácido nucleico objetivo.

En otro enfoque, se utilizan reactivos de afinidad que están marcados con una o la misma cantidad de moléculas de un solo tinte pero que discriminan entre los cuatro NLRT como resultado de diferentes eficiencias de unión (es decir, la cantidad promedio de reactivos de afinidad que se unen a un punto único en una matriz, por ejemplo, 10 % de todas las copias de la molécula de ADN objetivo para NLRT-A, 30 % para NLRT-T y 60 % para NLRT-C (y cero por ciento o unión poco detectable para NLRT-G). En un enfoque, los objetivos tienen el mismo grupo de bloqueo y se seleccionan reactivos de afinidad que tienen diferentes afinidades por su objetivo. En otro enfoque, se pueden modificar los grupos de bloqueo con pequeños cambios químicos para ajustar la eficacia de la unión del mismo reactivo de afinidad, generando así niveles de señal específicos de base. Por ejemplo, un grupo de bloqueo no modificado puede producir la señal más alta (100 % de la señal), un grupo de bloqueo con la modificación 1 puede producir un nivel de señal más bajo (por ejemplo, 50 %), un grupo de bloqueo con la modificación 2 puede producir una señal aún más baja con aún menos (25 %), etc.

En un enfoque relacionado, se pueden usar 2 grupos de bloqueo diferentes (azidometilo y cianoetoximetilo) y una variante química de cada uno (azidometil-primer y cianoetoximetil-primer) y dos anticuerpos para la secuenciación de 2 colores (2 colores $\times$ 2 intensidades). Por ilustración,

azidometil-dA	Agente de afinidad 1, color 1, baja intensidad (0-40 %)
azidometil-cebador-dC	Agente de afinidad 1, color 1, alta intensidad (60-100 %)
cianoetoximetil - dG	Agente de afinidad 2, color 2, baja intensidad (0-40 %)
cianoetoximetil-prima - dT	Agente de afinidad 2, color 2, alta intensidad (60-100 %)

En una realización, Agente de afinidad 1, color 1, baja intensidad tiene una intensidad de señal cercana a cero y Agente de afinidad 2, color 2, baja intensidad tiene una intensidad de señal más alta (25-40 %).

- 5 En una realización de enfoque relacionado, se puede llevar a cabo la secuenciación de 2 colores en la que se utiliza una única especie de nucleótido como una mezcla de nucleótidos en la que una parte se marca con un grupo de bloqueo y el resto se marca con el otro grupo de bloqueo. Por ilustración:

azidometil-dA	Grupo de bloqueo 1
cianoetoximetil - dG	Grupo de bloqueo 2
10 azidometil-cebador-dC	Mezcla con 70 % de nucleótidos del grupo de bloqueo 1 y 30 % de nucleótidos del grupo de bloqueo 2
cianoetoximetil-prima - dT	Mezcla con 30% de nucleótidos del grupo de bloqueo 1 y 70% de nucleótidos del grupo de bloqueo 2

- 15 En otro enfoque, solo se usa un reactivo de afinidad. Se utilizan mezclas de nucleótidos con diferentes proporciones del grupo bloqueador reconocido por el reactivo de afinidad para generar niveles de señal distinguibles. El resto de los nucleótidos en las mezclas tienen un grupo de bloqueo sin reactivo de afinidad correspondiente. Por ilustración:

dA	0 % grupo de bloqueo 1, 100 % grupo de bloqueo 2
dG	25% grupo de bloqueo 1, 75 % grupo de bloqueo 2
dC	50% grupo de bloqueo 1, 50 % grupo de bloqueo 2
dT	100% grupo de bloqueo 1, 0 % grupo de bloqueo 2

En otra realización, el anticuerpo podría reconocer dos bases (un dímero de nucleótido) donde se modifica la base corriente abajo con la adición de un grupo escindible o no escindible.

- 20 En otra realización, la última base incorporada se identifica mediante la unión de dos reactivos de afinidad en combinación: un reactivo de afinidad reconoce específicamente y se une a la nucleobase, y el segundo reactivo de afinidad reconoce específicamente y se une al grupo de bloqueo. Solo cuando ambos reactivos de afinidad se unen y/o están en proximidad espacial, se puede realizar una determinación de la identidad de la base terminal, tal como cuando los dos reactivos de afinidad incluyen un par donante-aceptor FRET como sus "marcadores" respectivos. Alternativamente, la unión de uno de los reactivos de afinidad podría conducir a un cambio conformacional que permita o mejore la unión del segundo reactivo de afinidad.

- 25 Se pueden usar los análogos de nucleósidos descritos en el presente documento en una variedad de métodos de secuenciación. Por ejemplo, se pueden usar los análogos en métodos de secuenciación de un marcador (a veces llamados "sin marcador"), de dos marcadores, de tres marcadores o de cuatro marcadores, en los que se emparejan los análogos sin marcación con reactivos de afinidad marcados directa o indirectamente de acuerdo con un esquema de uno, dos, tres o cuatro marcadores.

- 30 Los ejemplos de métodos de secuenciación de un solo marcadores incluyen, entre otros, métodos en los que se administran los análogos de nucleósidos que tienen diferentes nucleobases (por ejemplo, A, C, G, T) en sucesión y se detecta la incorporación detectando la presencia o ausencia de la misma señal o marcador para cada nucleobase diferente. Por lo tanto, los métodos de un solo marcador a veces se conocen como métodos de un solo color porque la señal de detección y/o el marcador es el mismo para todas las nucleobases, aunque puede diferir en intensidad (o estar ausente) para cada análogo de nucleósido. Por ejemplo, la incorporación de un nucleósido a un cebador mediante polimerización dirigida por plantilla mediada por la ADN polimerasa puede detectarse mediante la detección de un pirofosfato escindido del nucleósido pirofosfato. El pirofosfato puede detectarse usando un ensayo acoplado en el que la ATP sulfúrilasa convierte el pirofosfato en ATP, en

presencia de adenosina 5' fosfosulfato, que a su vez actúa como sustrato para la conversión de luciferina en oxiluciferina mediada por la luciferasa, generando luz visible en cantidades proporcionales a la generación de ATP.

De acuerdo con otra realización, se puede realizar la secuenciación de dos marcadores o dos colores usando los RT y los reactivos de afinidad descritos en el presente documento, usando dos señales distinguibles de forma combinatoria para detectar la incorporación de cuatro RT diferentes. Los ejemplos de sistemas, métodos y composiciones de dos marcadores incluyen, sin limitación, los descritos en la Patente de EE. UU. No. 8,617,811. Brevemente, en la secuenciación de dos marcadores, se detecta la incorporación de un primer RT (por ejemplo, RT-A) marcando el RT recién incorporado mediante la unión específica de un primer reactivo de afinidad que incluye un primer marcador, y luego detectando la presencia del primer marcador. Se detecta la incorporación de un segundo RT (por ejemplo, RT-C) marcando el segundo RT mediante la unión específica de un segundo reactivo de afinidad que incluye un segundo marcador, detectando luego la presencia del segundo marcador. Se detecta la incorporación de un tercer RT (por ejemplo, RT-T) marcando el tercer RT mediante la unión específica de un tercer reactivo de afinidad que incluye tanto el primero como el segundo marcador, detectando luego la presencia de los marcadores primero y segundo ; y se detecta la incorporación de un cuarto RT (por ejemplo, RT-G) detectando la ausencia de los marcadores primero y segundo, ya sea que esto resulte de la unión de un cuarto reactivo de afinidad que no está marcado o del hecho de que no hay un cuarto reactivo de afinidad incluido en el conjunto de reactivos de afinidad que se utiliza. En la secuenciación de dos colores, se distingue el primer marcador del segundo a marcador y se puede distinguir la combinación de los marcadores primero y segundo de los marcadores primero y segundo tomados individualmente.

De acuerdo con otra realización, se puede realizar la secuenciación de tres marcadores usando un primer RT marcado por unión específica de un primer reactivo de afinidad que incluye un primer marcador, un segundo RT marcado por unión específica de un segundo reactivo de afinidad que incluye un segundo marcador, un tercer RT marcado por unión específica de un tercer reactivo de afinidad que incluye un tercer marcador. Para el cuarto RT, se omite el reactivo de afinidad correspondiente del conjunto de reactivos de afinidad, o no está marcado, o incluye una combinación de dos o más de los marcadores primero, segundo y tercero (o una mezcla de reactivos de afinidad que están marcados con uno diferente de los marcadores y que se unen específicamente al cuarto RT). Los marcadores primero, segundo y tercero se distinguen entre sí.

De manera similar, la secuenciación de cuatro marcadores puede emplear un primer NLRT que está marcado por unión específica de un primer reactivo de afinidad que incluye un primer marcador, un segundo NLRT que está marcado por unión específica de un segundo reactivo de afinidad que incluye un segundo marcador, un tercer NLRT que se marca mediante la unión específica de un tercer reactivo de afinidad que incluye un tercer marcador, y un cuarto NLRT que se marca mediante la unión específica de un cuarto reactivo de afinidad que incluye un cuarto marcador. De nuevo, los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto se distinguen entre sí.

4.6 Reactivos de afinidad utilizados en combinación

Se pueden usar en combinación los reactivos de afinidad que reconocen diferentes epítomos de un solo NLRT. Por ejemplo, se puede usar un primer reactivo de afinidad que reconoce la porción de nucleobase del NLRT incorporado con un segundo reactivo de afinidad que reconoce un grupo de bloqueo. La tinción se puede realizar de forma simultánea o secuencial. En la tinción secuencial, se puede aplicar el segundo reactivo de afinidad mientras el primer reactivo de afinidad permanece unido al NLRT o después de retirar el primer reactivo de afinidad en el caso de volver a sondear (discutido a continuación).

4.7 Juegos de reactivos de afinidad

Los "juegos de reactivos de afinidad" se utilizan para marcar los RT utilizados en SBS. Por ejemplo, en una realización, para un conjunto de RT que incluye cuatro RT (RT-A, RT-T, RT-C y RT-G), podría haber un conjunto de reactivos de afinidad correspondiente de cuatro reactivos de afinidad, cada uno reconociendo y uniéndose específicamente a uno de los RT (antiA, antiT, antiC y antiG). Los juegos de reactivos de afinidad describen combinaciones de reactivos de afinidad que pueden (i) proporcionarse en forma de kit, como una mezcla o en recipientes separados y/o (ii) ponerse en contacto o combinarse en una matriz de secuenciación (por ejemplo, dentro de una celda de flujo de secuenciación).

De acuerdo con una realización, cada miembro de un conjunto de reactivos de afinidad tiene un marcador detectable distinguible diferente, como en SBS de cuatro colores.

De acuerdo con otra realización, un miembro de un juego de reactivos de afinidad no está marcado, mientras que los otros miembros están marcados. Alternativamente, el conjunto de reactivos de afinidad podría simplemente excluir el reactivo de afinidad sin marcación e incluir solo los reactivos de afinidad marcados.

Por ejemplo, de acuerdo con una realización, se marca un reactivo de afinidad con un primer marcador (por ejemplo, antiA); se marca un segundo reactivo de afinidad con un segundo marcador (por ejemplo, antiT); se marca un tercer reactivo de afinidad con un tercer marcador (por ejemplo, antiC); y un cuarto reactivo de

afinidad no está marcado o simplemente se excluye del conjunto de reactivos de afinidad (por ejemplo, antiG). Tal conjunto de reactivos de afinidad sería útil para la secuenciación de tres colores.

De acuerdo con otra realización, se marca un reactivo de afinidad (por ejemplo, antiA) con un primer marcador; se marca un segundo reactivo de afinidad (por ejemplo, antiT) con un segundo marcador; se marca un tercer reactivo de afinidad (por ejemplo, antiC) tanto con el primer marcador como con el segundo marcador; y un cuarto reactivo de afinidad (por ejemplo, antiG) no está marcado (o excluido del juego de reactivos de afinidad). Alternativamente, el tercer reactivo de afinidad puede incluir una mezcla de moléculas de reactivo de afinidad, todas las cuales se unen específicamente a una base particular (por ejemplo, todas son antiC), pero algunas incluyen el primer marcador y algunas incluyen el segundo marcador. Tales juegos de reactivos de afinidad serían útiles para la secuenciación de dos colores.

De acuerdo con otra realización, solo se usa un solo marcador detectable (o una sola combinación de dos o más marcadores), pero difiere en intensidad entre los miembros del conjunto, tal como cuando el reactivo de afinidad incluye diferentes cantidades del marcador (o de al menos un marcador de una combinación de dos o más marcadores). Por ejemplo, en una realización, se marca un primer reactivo de afinidad (por ejemplo, antiA) con un marcador en una primera intensidad; se marca un segundo reactivo de afinidad (por ejemplo, antiT) con el mismo marcador pero con una segunda intensidad; se marca un tercer reactivo de afinidad (por ejemplo, antiC) con el mismo marcador pero con una tercera intensidad; y un cuarto reactivo de afinidad (por ejemplo, antiG) no está marcado (o el cuarto reactivo de afinidad está excluido del conjunto de reactivos de afinidad). En otra realización, se marca un primer reactivo de afinidad (por ejemplo, antiA) con un primer marcador en una primera intensidad y un segundo marcador; se marca un segundo reactivo de afinidad (por ejemplo, antiT) con el mismo primer marcador pero con una segunda intensidad y el mismo segundo marcador; se marca un tercer reactivo de afinidad (por ejemplo, antiC) con el mismo primer marcador pero con una tercera intensidad y el mismo segundo marcador; y un cuarto reactivo de afinidad (por ejemplo, antiG) no está marcado, está marcado solo con el segundo marcador o está excluido del juego de reactivos de afinidad.

4.8 Mezclas de reacción

Se pueden usar Los análogos de nucleósidos (por ejemplo, NLRT) y los oligonucleótidos o polinucleótidos que contienen dichos análogos de nucleósidos o sus productos de reacción como componente de una mezcla de reacción. Por ejemplo, se pueden usar dichos componentes en mezclas de reacción para la secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, SBS). Ejemplos de mezclas de reacción incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen (a) ácido nucleico plantilla; (b) polimerasa; (c) cebador oligonucleotídico; (d) un análogo de nucleósido bloqueado reversiblemente en 3'-O, o una mezcla de análogos de nucleósido bloqueados reversiblemente en 3'-O que tienen nucleobases estructuralmente diferentes; y (e) un reactivo de afinidad marcado. Ejemplos de mezclas de reacción de secuenciación de la invención incluyen, pero no se limitan a, matrices que comprenden una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos plantilla inmovilizados en diferentes ubicaciones en la matriz; (b) polimerasa; (c) cebador oligonucleotídico; (d) y uno o una mezcla de NLRT. Ejemplos de mezclas de reacción de secuenciación de la invención incluyen, pero no se limitan a, matrices que comprenden una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos plantilla inmovilizados en diferentes ubicaciones en la matriz; (b) cadenas de ADN en crecimiento (GDS) (que pueden comprender un NLRT en 3'; y (c) uno o más reactivos de afinidad (por ejemplo, un juego de reactivos de afinidad como se describe anteriormente).

5. Plantilla de ácidos nucleicos y matrices de ácidos nucleicos

En diversas realizaciones, el polinucleótido plantilla es ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN del transcriptoma o microbioma, productos de amplificación, etc.) o ARN. En diversas realizaciones, el polinucleótido es de doble cadena o de cadena sencilla.

En algunas realizaciones, se inmoviliza el ácido nucleico plantilla sobre una superficie sólida. En algunas realizaciones, se inmoviliza el ácido nucleico plantilla en un sustrato (por ejemplo, una perla, una celda de flujo, una almohadilla, un canal en un dispositivo de microfluidos y similares). El sustrato puede comprender silicio, vidrio, oro, un polímero, PDMS y similares.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico plantilla está inmovilizado o contenido dentro de una gota (opcionalmente inmovilizado en una perla u otro sustrato dentro de la gota).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico plantilla es un concatémero de ADN inmovilizado que comprende múltiples copias de una secuencia objetivo. En algunas realizaciones, se representa el ácido nucleico plantilla como un concatémero de ADN, tal como una nanobola de ADN (DNB) que comprende múltiples copias de una secuencia diana y una "secuencia adaptadora". Véase Publicación de Patente PCT. WO 2007/133831. En algunas realizaciones, la plantilla es una sola molécula de polinucleótido. En algunas realizaciones, la plantilla está presente como una población clonal de moléculas plantilla (por ejemplo, una población clonal producida por amplificación puente o amplificación Wildfire).

Se entenderá que el método no se limita a una forma particular de plantilla, y la plantilla puede ser cualquier plantilla tal como, por ejemplo, un concatémero de ADN, un dendrímero, una población clonal de plantillas (p.

o amplificación Wildfire) o una sola molécula de polinucleótido. Por lo tanto, la especificación debe leerse como si cada referencia a una plantilla pudiera referirse alternativamente a una plantilla de concatémero, un dendrímero, una población clonal de, por ejemplo, plantillas lineales cortas, una plantilla de una sola molécula (por ejemplo, en una guía de onda de modo cero) y plantillas en otras formas.

- 5 Se describen con más detalle los ácidos nucleicos plantilla adecuados, que incluyen DNB, agrupaciones, colonias y matrices o grupos de los mismos, en la Patente de EE.UU. Nos. 8,440,397; 8,445,194; 8,133,719; 8,445,196; 8,445,197; 7,709,197; 12/335,168; 7,901,891; 7,960,104; 7,910,354; 7,910,302; 8,105,771; 7,910,304; 7,906,285; 8,278,039; 7,901,890; 7,897,344; 8,298,768; 8,415,099; 8,671,811; 7,115,400; 8,236,499, y Publicación de Patente de EE.UU. Nos. 2015/0353926; 2010/0311602; 2014/0228223; y 10 2013/0338008.

- En un aspecto, la invención proporciona una matriz de ADN que comprende: una pluralidad de moléculas de ADN plantilla, cada molécula de ADN unida en una posición de la matriz, una secuencia de ADN complementaria apareada con una porción de la molécula de ADN plantilla en una pluralidad de posiciones, en la que la secuencia de ADN complementaria comprende en su extremo 3' un primer desoxirribonucleótido 15 terminador reversible incorporado; y un primer reactivo de afinidad unido específicamente a al menos algunos de los primeros desoxirribonucleótidos terminadores reversibles. En un enfoque, la matriz de ADN comprende productos de extensión de cebadores con nucleótidos terminales 3' que comprenden nucleobases A, T, G o C o análogos de las mismas, y reactivos de afinidad unidos a los productos de extensión de cebadores.

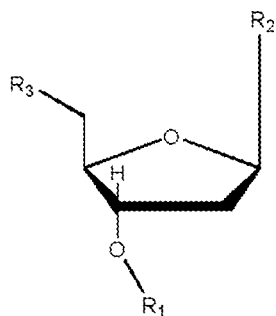
6. Kits

- 20 Se pueden proporcionar kits para poner en práctica la invención. Como se describió anteriormente, se pueden proporcionar los equipos de NLRT y NLRT en forma de kit. También como se ha descrito anteriormente, se pueden proporcionar los reactivos de afinidad y los conjuntos de reactivos de afinidad en forma de kit. También se contemplan kits que comprenden tanto NLRT como conjuntos de NLRT y reactivos de afinidad o conjuntos 25 de reactivos de afinidad. Por ejemplo, se describen kits que incluyen, sin limitación (a) un nucleótido terminador reversible (RT) o conjunto de RT que incluye uno, dos, tres, cuatro o más RT individuales diferentes; (b) un reactivo de afinidad correspondiente o conjunto de reactivos de afinidad que incluye uno, dos, tres, cuatro o más reactivos de afinidad, cada uno de los cuales es específico para una de los RT; y (c) materiales de empaquetado y/o instrucciones de uso.

- 30 Se describe un kit que comprende una pluralidad de RT, en la que cada RT comprende una nucleobase diferente, y una pluralidad de reactivos de afinidad, en la que cada reactivo de afinidad se une específicamente a uno de los RT.

- En un ejemplo, se describe un kit que comprende (a) un nucleótido terminador reversible como se describe en el presente documento que puede incorporarse en un producto de extensión de cebador; (b) un primer reactivo 35 de afinidad que se une específicamente al nucleótido terminador reversible cuando se incorpora en el terminal 3' de un producto de extensión del cebador; y (c) empaquetado para (a) y (b). En un enfoque, el kit contiene una pluralidad de desoxirribonucleótidos de terminación reversible, en el que cada desoxirribonucleótido de terminación reversible comprende una nucleobase diferente, y una pluralidad de primeros reactivos de afinidad, en la que cada primer reactivo de afinidad se une específicamente a uno diferente de los desoxirribonucleótidos de terminación reversible. Los primeros reactivos de afinidad pueden estar marcados de manera detectable y 40 se pueden distinguir entre sí. El kit puede comprender reactivos de afinidad secundaria. Los reactivos de afinidad primero y/o segundo pueden ser anticuerpos.

En un ejemplo, el desoxirribonucleótido de terminación reversible tiene la estructura de Fórmula I:



Fórmula I

- 45 en la que R₁ es un grupo bloqueador reversible en 3'-O; R₂ es una nucleobase seleccionada de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y análogos de las mismas; y R₃ comprende uno o más fosfatos.

7. Aplicaciones

Además de las aplicaciones de SBS descritas anteriormente, los nuevos reactivos de afinidad, NLRT, se pueden usar kits y métodos descritos en el presente documento en muchas otras aplicaciones, tales como la detección de lo que hay al final del ADN fragmentado de forma natural o experimental (o en las brechas de ADN); capturar oligonucleótidos o polinucleótidos con una base de extremo específica (extremo de la molécula o extremo dentro de la brecha de una cadena) con o sin modificación específica. Pueden detectarse las bases del extremo/brecha tanto en 5' como en 3'. Los reactivos de afinidad se pueden usar para la ligadura, la hibridación y otras detecciones.

Se apreciará que los métodos de la invención también se pueden usar para la secuenciación directa de ARN.

8. Métodos

8.1 Eliminación de grupos de bloqueo, eliminación de reactivos de afinidad y detección

La eliminación de los grupos de bloqueo y los reactivos de afinidad puede ocurrir simultáneamente. En un enfoque, una matriz se expone a condiciones en las que se eliminan simultáneamente los grupos de bloqueo y los reactivos de afinidad. En uno, se pone en contacto la matriz con una solución con una combinación de agentes, algunos de los cuales dan como resultado la eliminación de los reactivos de afinidad (por ejemplo, alto contenido de sal, competidores de moléculas pequeñas, proteasa, etc.) combinados con agentes que escinden el grupo de bloqueo.

En algunos casos, la eliminación del grupo de bloqueo 3' da como resultado la eliminación del reactivo de afinidad. Sin pretender limitarse a un mecanismo particular, se cree que, en estos casos, la eliminación de la unidad estructural de bloqueo destruye el epítipo requerido para la unión del anticuerpo u otro reactivo de afinidad.

En un enfoque diferente, la eliminación del reactivo de afinidad y el grupo de bloqueo se desacopla, de modo que el reactivo de afinidad se elimina, pero el grupo de bloqueo no se escinde del azúcar de nucleótido. Esto es útil cuando se desea reprimir. Véase la Figura 2, Sección 9, a continuación, y el Ejemplo 11.

Se apreciará que las condiciones para la eliminación de reactivos de afinidad y/o grupos de bloqueo se seleccionarán para preservar la integridad del ADN que se está secuenciando.

8.1.1 Eliminación de grupos de bloqueo

Los análogos de nucleósidos o NLRT incluyen aquellos que están bloqueados de forma reversible en 3'-O. En algunos aspectos, el grupo de bloqueo proporciona la incorporación controlada de un solo NLRT bloqueado reversiblemente en 3'-O en el extremo 3' de un cebador, por ejemplo, un GDS extendido en un ciclo de secuenciación anterior.

Generalmente, en cada ciclo de secuenciación en el que se usan NLRT, se elimina el grupo de bloqueo y se disocia el reactivo de afinidad del NLRT. Estos pasos pueden llevarse a cabo simultáneamente. Por ejemplo, se puede eliminar un grupo de bloqueo azidometilo mediante tratamiento con fosfina (un proceso ampliamente utilizado) y se puede eliminar un reactivo de afinidad de anticuerpos mediante tratamiento con un pH bajo (por ejemplo, glicina 100 mM, pH 2,8) o un pH alto (por ejemplo, 100 mM glicina pH 10), alto contenido de sal o regulador de separación caotrópico. En una realización, se puede usar un único tratamiento o condición para eliminar tanto el NLRT como el reactivo de afinidad (por ejemplo, fosfina en un regulador con alto contenido de sal). En algunas realizaciones, la eliminación del grupo de bloqueo da como resultado la disociación del reactivo de afinidad si, por ejemplo, se requiere el grupo de bloqueo para la unión del reactivo de afinidad.

Se puede eliminar el grupo de bloqueo reversible en 3'-O mediante escisión enzimática o escisión química (por ejemplo, hidrólisis). Se pueden seleccionar las condiciones para la eliminación por un experto en la técnica con base en las descripciones proporcionadas en el presente documento, la identidad química del grupo de bloqueo que se va a escindir y los principios químicos de los ácidos nucleicos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se elimina el grupo de bloqueo poniendo en contacto el nucleósido bloqueado reversiblemente con un agente reductor como ditioneitol (DTT) o un reactivo de fosfina como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris(hidroximetil)fosfina (THP) o tris(hidroxipropil)fosfina. En algunos casos, se elimina el grupo de bloqueo lavando el grupo de bloqueo del análogo de nucleótido incorporado utilizando un agente reductor tal como un reactivo de fosfina. En algunos casos, el grupo de bloqueo es fotolábil, y se puede eliminar el grupo de bloqueo mediante la aplicación de, por ejemplo, luz ultravioleta. En algunos casos, se puede eliminar el grupo de bloqueo poniendo en contacto el análogo de nucleósido con una reacción catalizada por un metal de transición usando, por ejemplo, una solución acuosa de paladio (Pd). En algunos casos, se puede eliminar el grupo de bloqueo poniendo en contacto el análogo de nucleósido con una solución acuosa de nitrato. Además, o alternativamente, se puede eliminar el grupo de bloqueo cambiando el pH de la solución o mezcla que contiene el análogo de nucleótido incorporado. Por ejemplo, en algunos casos, se puede eliminar el grupo de bloqueo poniendo en contacto el análogo de nucleósido con ácido o una solución acuosa tamponada con pH bajo (por

ejemplo, menos de 4). Como otro ejemplo, en algunos casos, se puede eliminar el grupo de bloqueo poniendo en contacto el análogo de nucleósido con una base o una solución acuosa tamponada con pH alto (por ejemplo, superior a 10).

Los grupos de bloqueo reversibles en 3'-O que pueden escindirse mediante un agente reductor, tal como una fosfina, incluyen, pero no se limitan a, azidometilo. Los grupos de bloqueos reversibles en 3'-O que pueden escindirse mediante luz ultravioleta incluyen, entre otros, nitrobenzilo. Los grupos de bloqueo reversibles en 3'-O que pueden escindirse al ponerse en contacto con una solución acuosa de Pd incluyen, pero no se limitan a, alilo. Los grupos de bloqueo reversibles en 3'-O que se pueden escindir con ácido incluyen, pero no se limitan a, metoximetilo. Los grupos de bloqueo reversibles en 3'-O que pueden escindirse poniéndose en contacto con una solución acuosa tamponada (pH 5,5) de nitrito de sodio incluyen, pero no se limitan a, aminoalcoxilo.

8.1.2 Eliminación de reactivos de afinidad

Se pueden eliminar los reactivos de afinidad con base en anticuerpos con pH bajo, pH alto, sal alta o baja o agentes desnaturizantes tal como un regulador de separación caotrópica. Se pueden eliminar otras clases de reactivos de afinidad (por ejemplo, aptámeros) por cualquier medio conocido en la técnica. Además, se pueden eliminar los reactivos de afinidad, tales como los anticuerpos, introduciendo un agente que compita con el epítipo unido por la unión del reactivo de afinidad, por ejemplo, tal como se ilustra en el Ejemplo 10 a continuación.

Además, también se pueden eliminar los reactivos de afinidad alterando la capacidad del agente para unirse al NLRT incorporado. Normalmente, esto ocurre cuando el grupo de bloqueo 3' se escinde del análogo de nucleótido incorporado. En los casos en los que la unión del reactivo de afinidad depende de la presencia del grupo de bloqueo (por ejemplo, en los casos en los que un epítipo reconocido por un anticuerpo 1° incluye el grupo de bloqueo o una parte del mismo), la eliminación del grupo de bloqueo da como resultado la liberación del reactivo de afinidad también.

La eliminación simultánea de reactivos de afinidad y grupos de bloqueo también puede ocurrir simultáneamente mediante la adición de una solución que comprende un componente de escisión del grupo de bloqueo (por ejemplo, un reactivo de fosfina) y un agente de liberación del reactivo de afinidad (por ejemplo, alto contenido de sal).

Alternativamente, se puede eliminar un reactivo de afinidad sin eliminar el grupo de bloqueo 3'. Este enfoque es útil cuando se desea reprobador (como se describe en la Sección 9, a continuación).

8.1.3 Detección

Los métodos para detectar un evento de unión variarán con la naturaleza de los marcadores detectables que se utilicen y son bien conocidos en la técnica. La detección (por ejemplo, de una señal fluorescente) generalmente se realiza antes de la eliminación del grupo de bloqueo. Sin embargo, la detección se puede realizar antes o después de la eliminación del grupo de bloqueo siempre que el reactivo de afinidad marcado permanezca unido.

8.2 Producción de anticuerpos

Por ejemplo, los compuestos pequeños (fármacos o péptidos) no son suficientemente complejos por sí mismos para inducir una respuesta inmunitaria o ser procesados de manera que provoquen la producción de anticuerpos específicos. Para que la producción de anticuerpos tenga éxito con antígenos pequeños, deben conjugarse químicamente con proteínas portadoras inmunogénicas tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH). Se pueden mezclar e inyectar los adyuvantes con un inmunógeno para aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria. Se describen la conjugación de proteínas portadoras, el uso de adyuvantes y otros aspectos relacionados con la preparación de muestras para inyección en esta sección sobre producción de anticuerpos. Pueden usarse procedimientos estándar para generar, purificar y modificar anticuerpos para usar como sondas específicas de antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988) and Harlow and Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual" (1999).

Haptenos: Las moléculas pequeñas que se utilizan como antígenos se denominan haptenos. Pueden actuar como sitios de reconocimiento para la producción de anticuerpos específicos, pero por sí mismos no pueden estimular la respuesta inmunitaria necesaria. Los haptenos pueden volverse inmunogénicos acoplándolos a una molécula portadora adecuada.

Epítopos: Un epítipo es el sitio específico de un antígeno al que se une un anticuerpo. Para antígenos muy pequeños, prácticamente toda la estructura química puede actuar como un solo epítipo. Dependiendo de su complejidad y tamaño, un antígeno puede efectuar la producción de anticuerpos dirigidos a numerosos epítopos. Los anticuerpos policlonales son mezclas de inmunoglobulinas séricas y, en conjunto, es probable que se unan a múltiples epítopos del antígeno.

Hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH). La hemocianina de lapa californiana (KLH) es la proteína transportadora más utilizada.

Albúmina de suero bovino. La albúmina de suero bovina (BSA; 67kDa) pertenece a la clase de proteínas séricas denominadas albúminas.

5 8.3 Protocolos de vacunación

Los protocolos de inmunización son bien conocidos y solo se describen de forma general aquí. Véase el Ejemplo 2, a continuación, para obtener descripciones adicionales. La concentración del inmunógeno antes de mezclarlo con el adyuvante determinará en última instancia la cantidad de conjugado que se administrará por inyección. Programa de vacunación para ratones: Día 0: Recoja el suero preinmune del ratón para usarlo como blanco al realizar el cribado ELISA después de la inmunización. Conservar congelado. Inyecte de 50 a 100 µg de inmunógeno (igual a 100 a 200 µL de mezcla de antígeno y adyuvante) por ratón. Las rutas típicas de inyección incluyen intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.). Se pueden realizar una o dos inyecciones de este tipo por animal. Día 14: Refuerzo con una cantidad equivalente de inmunógeno en adyuvante. Día 21: Pruebe la sangre y analice la respuesta de anticuerpos por ELISA. (Normalmente, los ratones se sangran bajo anestesia a través de la vena de la cola o del plexo retroorbitario). Día 28: Refuerzo de nuevo si es necesario. Continúe con un programa similar de refuerzos alternos y pruebas de sangrado hasta que se observe una respuesta satisfactoria. Para la producción de anticuerpos monoclonales, inyecte ya sea i.p. o por vía intravenosa (i.v.) 4 a 5 días antes de la fusión con el inmunógeno disuelto en solución salina (sin adyuvante).

Calendario de vacunas para conejos: Día 0: Recoja el suero preinmune del conejo para usarlo como blanco al realizar ELISA después de la inmunización. Conservar congelado. Inyecte 100 µg de inmunógeno (igual a aproximadamente 200 µL de la mezcla de adyuvante de antígeno) en cada uno de los 8 a 10 sitios subcutáneos en la espalda del conejo. También se pueden usar otras rutas de inyección, pero esta es, con mucho, la más fácil con el conejo. Día 14: Reforzar con una cantidad equivalente de adyuvante. Día 21: Pruebe la sangre y analice la respuesta de anticuerpos por ELISA. (Normalmente, los conejos se sangran a través de la vena del oído sin anestesia). No es difícil recolectar de 5 a 10 mL de sangre, que es más que suficiente para medir la respuesta de anticuerpos. Día 28: Refuerzo de nuevo si es necesario. Continúe con un programa similar de refuerzos alternos y pruebas de sangrado hasta que se observe una respuesta satisfactoria.

Purificación General de Inmunoglobulinas. Debido a que los anticuerpos tienen una estructura predecible, incluyendo dominios relativamente invariantes, ha sido posible identificar ciertos ligandos de proteínas que son capaces de unirse generalmente a los anticuerpos, independientemente de la especificidad del anticuerpo por el antígeno. La Proteína A, la Proteína G y la Proteína L son tres proteínas bacterianas cuyas propiedades de unión a anticuerpos han sido bien caracterizadas. Estas proteínas se han producido de forma recombinante y se han utilizado de forma rutinaria para la purificación por afinidad de tipos de anticuerpos clave de una variedad de especies. También está disponible una forma recombinante modificada genéticamente de la Proteína A y G, llamada Proteína A/G. Estas proteínas de unión a anticuerpos están disponibles inmovilizadas en resina de agarosa en perlas.

8.4 Purificación por afinidad de anticuerpos:

Se utilizan diversos métodos para enriquecer o purificar una proteína de interés de otras proteínas y componentes en un lisado celular crudo u otra muestra. El más poderoso de estos métodos es la cromatografía de afinidad, también llamada purificación por afinidad, mediante la cual la proteína de interés se purifica en virtud de sus propiedades de unión específicas a un ligando inmovilizado.

Se pueden purificar las proteínas y otras macromoléculas de interés a partir de extractos crudos u otras mezclas complejas mediante una variedad de métodos. La precipitación selectiva es quizás el método más simple para separar un tipo de macromolécula de otro.

Sin embargo, la mayoría de los métodos de purificación involucran alguna forma de cromatografía en la que se separan las moléculas en solución (fase móvil) con base en las diferencias en la interacción química o física con un material estacionario (fase sólida). La filtración en gel (también llamada cromatografía de exclusión por tamaño o SEC) utiliza un material de resina porosa para separar las moléculas con base en el tamaño (es decir, exclusión física). En la cromatografía de intercambio iónico, se separan las moléculas de acuerdo con la fuerza de su interacción iónica general con un material en fase sólida (es decir, interacciones no específicas).

Por el contrario, la cromatografía de afinidad (también denominada purificación por afinidad) utiliza interacciones de unión específicas entre moléculas. Un ligando particular se inmoviliza químicamente o se "acopla" a un soporte sólido de modo que cuando una mezcla compleja pasa por la columna, aquellas moléculas que tienen afinidad de unión específica al ligando se unen. Después de lavar otros componentes de la muestra, se separa la molécula unida del soporte, lo que da como resultado su purificación a partir de la muestra original.

Cada sistema de afinidad específico requiere su propio conjunto de condiciones y presenta sus propios desafíos peculiares para un propósito de investigación dado. Otros artículos de Métodos de Proteína describen los factores y condiciones asociados con sistemas de purificación particulares

8.5 Marcado de anticuerpos

- 5 Estructura de anticuerpos y sitios de modificación. Se pueden modificar covalentemente los anticuerpos, al igual que otras proteínas, de muchas maneras para adaptarse al propósito de un ensayo en particular. Muchos métodos inmunológicos implican el uso de anticuerpos marcados y se han creado una variedad de reactivos para permitir el marcado de anticuerpos. Se utilizan comúnmente las enzimas, la biotina, los fluoróforos y los isótopos radiactivos para proporcionar una señal de detección en los ensayos biológicos. Comprender los
- 10 grupos funcionales disponibles en un anticuerpo es la clave para elegir el mejor método de modificación, ya sea para el marcado, el entrecruzamiento o la inmovilización covalente. La mayoría de las estrategias de marcado de anticuerpos utilizan uno de tres objetivos: (1) Aminas primarias (-NH₂): se encuentran en los residuos de lisina y en el extremo N de cada cadena polipeptídica. Son numerosos y están distribuidos por todo el anticuerpo. (2) Grupos sulfhidrilo (-SH): se encuentran en los residuos de cisteína y existen como enlaces
- 15 disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula completa. Se pueden reducir selectivamente los disulfuros de la región bisagra para hacer que los sulfhidrilos libres estén disponibles para el marcado dirigido. (3) Hidratos de carbono (azúcares): la glicosilación se produce principalmente en la región Fc de los anticuerpos (IgG). Los azúcares componentes en estas fracciones de polisacáridos que contienen cis-dioles se pueden oxidar para crear aldehídos activos (-CHO) para el acoplamiento.
- 20 Métodos de marcado de anticuerpos. Se puede utilizar en la práctica de la presente invención cualquier método conocido para marcar anticuerpos. Los anticuerpos, como todas las proteínas, están compuestos de aminoácidos, y se usa comúnmente la cadena lateral de lisina, que termina en una amina primaria (-NH₂), para unir marcadores covalentemente a moléculas de anticuerpo.

Los cuatro enfoques químicos principales para el marcado de anticuerpos se resumen a continuación:

- 25 1. Ésteres de NHS. En el caso de los marcadores de tintes fluorescentes, es habitual comprar una forma activada del marcador con un éster de NHS incorporado (también llamado "éster de succinimidilo"). Se puede hacer reaccionar el tinte activado bajo condiciones apropiadas con anticuerpos (todos los cuales tienen múltiples grupos lisina). Se elimina el exceso de tinte reactivo mediante uno de varios métodos posibles (a menudo cromatografía en columna) antes de que el anticuerpo marcado pueda usarse en un inmunoensayo.
- 30 2. Reactivos heterobifuncionales. Si el marcador es una molécula de proteína (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante [HRP], fosfatasa alcalina o ficoeritrina), el procedimiento de marcado del anticuerpo se complica por el hecho de que el anticuerpo y el marcador tienen varias aminas. En esta situación, es habitual modificar algunas de las lisinas de una molécula (por ejemplo, el anticuerpo) para crear un nuevo grupo reactivo (X) y las lisinas del marcador para crear otro grupo reactivo (Y). Se utiliza un "reactivo heterobifuncional" para
- 35 introducir los grupos Y, que posteriormente reaccionan con los grupos X cuando se mezclan el anticuerpo y el marcador, creando así conjugados heterodiméricos. Hay muchas variaciones sobre este tema y se encontraran cientos de ejemplos en la literatura sobre el uso de reactivos heterobifuncionales para crear anticuerpos marcados y otras biomoléculas marcadas.
- 40 3. Carbodiimidas. Se utilizan estos reactivos (EDC es un ejemplo muy común) para crear enlaces covalentes entre moléculas que contienen amina y carboxilo. Las carbodiimidas activan los grupos carboxilo y, a continuación, el intermedio activado es atacado por una amina (por ejemplo, proporcionada por un residuo de lisina en un anticuerpo). Se usan comúnmente las carbodiimidas para conjugar anticuerpos con partículas carboxiladas (por ejemplo, partículas de látex, perlas magnéticas) y con otras superficies carboxiladas, tales como placas de micropocillos o superficies de chips. Las carbodiimidas rara vez se usan para unir tintes o
- 45 marcadores de proteínas a los anticuerpos, aunque son importantes en la producción de tintes activados por NHS (véase arriba).
4. Peryodato de sodio. Este producto químico no se puede emplear con la gran mayoría de los marcadores, pero es un reactivo bastante importante ya que es aplicable a HRP, la enzima de diagnóstico más popular. El peryodato activa las cadenas de carbohidratos en la molécula de HRP para crear grupos aldehído, que son
- 50 capaces de reaccionar con las lisinas en las moléculas de anticuerpos. Dado que la propia HRP tiene muy pocas lisinas, es relativamente fácil crear conjugados de anticuerpo-HRP sin una polimerización significativa de HRP.

En cualquier clon de anticuerpo particular, las lisinas (aminas primarias) pueden aparecer de manera prominente dentro del sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, el único inconveniente de esta estrategia de

55 marcaje es que ocasionalmente causa una disminución significativa en la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La disminución puede ser particularmente pronunciada cuando se trabaja con anticuerpos monoclonales o cuando se intenta agregar una alta densidad de marcadores por molécula de anticuerpo.

9. Resonancia

Como se indicó en la Sección 8 anterior, es posible de acuerdo con la invención desacoplar la eliminación de los reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) y los grupos protectores 3'. Debido a que se pueden eliminar los reactivos de afinidad sin eliminar el resto de bloqueo, es ventajosamente posible volver resonar algunas o todas las posiciones de base para aumentar la precisión de la conmutación de base, probar la integridad del chip o por otras razones. Véase el Ejemplo 11, a continuación, y la Figura 2. Se puede sondear cualquier posición base dada una vez y reprobado 0, 1, 2 o más de 2 veces. Por lo general, una sola ronda de resonancia se considera suficiente. Únicamente por conveniencia, en un caso en el que una posición base se sondea dos veces, la primera ronda de sondeo puede denominarse primer medio ciclo y la segunda ronda de sondeo puede denominarse segundo medio ciclo.

Al volver a sondear, es posible sondear cada posición dos veces con el mismo reactivo de afinidad, por ejemplo, el mismo anticuerpo primario. Más a menudo, se utiliza un reactivo de afinidad diferente, como una preparación de anticuerpo diferente (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal diferente), una clase diferente de reactivo de afinidad (por ejemplo, sondeo con un anticuerpo en el primer medio ciclo y con un aptámero en el segundo medio ciclo), o un reactivo de afinidad con una especificidad diferente. Por ejemplo, en el primer medio ciclo, se puede sondear una matriz con anti-A, anti-T, anti-C y anti-G, y en el segundo medio ciclo, la matriz se puede sondear con antipurina y antipirimidina.

En un enfoque, se bloquean cuatro NLRT con dos grupos de bloqueo, por ejemplo, azidometil-T, azidometil-G, cianoetenil-C y cianoetenil-A, y la matriz se sondea una vez con dos reactivos de afinidad (uno específico para 3'-O-azidometil-2'-desoxirribosa y el otro específico para 3'-O-cianoetenil-2'-desoxirribosa) y sondeada por segunda vez con un par diferente de reactivos de afinidad (uno específico para purinas y otro específico para pirimidinas). Una dirección en una matriz que muestre la característica de señal de 3'-O-azidometil-2'-desoxirribosa y purina se identificaría como que tiene una base de guanina, y así sucesivamente.

10. Proceso de secuenciación

Las FIGURAS 1 y 2 brindan orientación adicional al lector, pero no deben interpretarse como limitantes. Por ejemplo, cuando se utiliza un reactivo de afinidad para detectar un 3'-OH terminal de un producto de extensión (véase la Sección 3.8 anterior), se eliminará el grupo de bloqueo (Paso 8b) antes de la tinción del anticuerpo (Paso 5).

Como se discutió anteriormente, en un aspecto, la invención se refiere a un método de secuenciación por síntesis (SBS) que utiliza nucleótidos de terminación reversibles sin marcación. Los métodos de SBS son bien conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los métodos descritos en las referencias citadas en el presente documento. Normalmente, SBS determina la secuencia de una plantilla de ácido nucleico monocatenario inmovilizado en una posición en una superficie. Como es sabido por el lector con experiencia ordinaria en la técnica, normalmente hay muchas copias de la plantilla en una posición sobre la superficie. A modo ilustrativo y no limitativo, se producen las copias de la plantilla con mayor frecuencia utilizando métodos de nanoesferas de ADN (DNB) o métodos de PCR puente. Los métodos DNB dan como resultado un concatémero monocatenario con muchas copias de la plantilla (por ejemplo, secuencias de ADN genómico y sitios de unión de cebadores adyacentes). Los métodos de PCR puente dan como resultado un grupo clonal de moléculas plantilla (por ejemplo, secuencias de ADN genómico flanqueadas por adaptadores que pueden servir como sitios de unión de cebadores). En la PCR puente pueden estar presentes ambas cadenas del ácido nucleico plantilla, como cadenas individuales separadas. Se entenderá que las referencias en el presente documento a un ácido nucleico "plantilla" (es decir, forma gramatical singular), o términos equivalentes, también se refieren a una pluralidad de copias de una plantilla en una posición dada sobre un sustrato. También se reconocerá que, aunque en el presente documento se puede hacer referencia a la determinación de la secuencia de un ácido nucleico plantilla o una secuencia de ácido nucleico plantilla (es decir, una forma gramatical singular), se contempla que se lleven a cabo los métodos de la invención utilizando matrices que comprenden una pluralidad (a menudo cientos de millones) de posiciones que contienen una o una pluralidad de moléculas de ácido nucleico plantilla.

Tal como se usa en este contexto, "matriz" se usa en el sentido más amplio e incluye, a menos que se especifique lo contrario, matrices ordenadas (lo que significa que las regiones de unión de plantillas están dispuestas en un patrón ordenado, típicamente rectilíneo, tal como una cuadrícula, espiral u otros patrones) y matrices desordenadas (lo que significa que las regiones de unión de la plantilla están en posiciones aleatorias). En un enfoque, la identidad de las plantillas en cualquier posición específica (o "dirección") en una matriz puede conocerse antes de la secuenciación de las plantillas. Más a menudo, la matriz es una "matriz aleatoria" en la que la identidad de una plantilla en una dirección determinada no se conoce antes de la secuenciación. A menos que se especifique lo contrario, en esta divulgación "matriz" no se limita a posiciones en una superficie plana, sino que puede incluir matrices de perlas, matrices de gotas y similares.

Se pueden usar diversos métodos de SBS con los análogos de nucleósidos y los reactivos de afinidad de la presente invención. En algunos aspectos, los métodos SBS se pueden seleccionar de los descritos en la Patente de EE. UU. Nos. 6,210,891; 6,828,100; 6,833,246; 6,911,345; 6,969,488; 6,897,023; 6,833,246; and 6,787,308; Publicación de Patente de EE. UU. Nos. 2003/0064398; 2003/0022207; 2016/0130647; y

Publicación de Patente PCT Documento WO 2016/133764; Margulies et al., 2005, Nature 437:376-380; Ronaghi et al., 1996, Anal. Biochem. 242:84-89; Constans, A., 2003, The Scientist 17(13):36; y Bentley et al., 2008, Nature 456(7218):53-59. Los secuenciadores de ADN que realizan la secuenciación por síntesis están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Illumina Inc. (San Diego, CA), incluyendo los sistemas de secuenciación MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, HiSeq X y NovaSeq. Otros sistemas de secuenciación de ADN que se pueden usar con las composiciones y métodos de la presente invención incluyen BGISEQ-50, BGISEQ-500, BGISEQ-1000, MGI-200 y MGISEQ-2000 (BGI, Shenzhen, República Popular de China); y la plataforma de secuenciación GeneReader (QIAGEN, Manchester, Reino Unido).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación con base en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente en Ion Torrent (Guilford, Conn., una subsidiaria de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en la Patente de EE. UU. Publicaciones de solicitud Nos. 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o 2010/0282617 A1.

Se pueden utilizar junto con las composiciones y métodos de la presente invención otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tales como, por ejemplo, la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico nascente (Ronaghi et al., Anal Biochem 242:84-89, 1996; Ronaghi, Genoma Res. 11:3-11, 2001; Ronaghi et al., Science 281:363, 1998); y Patente de EE. UU. Nos. 6,210,891; 6,258,568 y 6,274,320. En la pirosecuenciación, se puede detectar el PPi liberado al convertirlo en trifosfato de adenosina (ATP) mediante ATP sulfúrilasa, y se puede detectar el ATP resultante a través de fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, se puede controlar la reacción de secuenciación a través de un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Se describen los sistemas fluidicos, detectores y procedimientos útiles que pueden usarse para la aplicación de pirosecuenciación a matrices de la presente descripción, por ejemplo, en la Solicitud de Patente WIPO Ser. No. PCT/US11/57111, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2005/0191698 A1, Patente de EE. UU. No. 7,595,883, y Patente de EE. UU. No. 7,244,559.

En algunos aspectos, se pueden seleccionar los métodos de secuenciación por ligadura de los descritos en Publicación de Solicitud de Patente PCT. WO 1999/019341; WO 2005/082098; WO 2006/073504; y Shendure et al., 2005, Science, 309: 1728-1739. Los métodos SBS pueden emplear las matrices de nanobolas de ADN ordenadas que se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente de EE. UU. 2010/0105052, 2007/099208, y EE. UU. 2009/0264299) y las Publicaciones de Patente PCT. WO 2007/120208, WO 2006/073504, y WO 2007/133831.

De acuerdo con una realización, se realiza la secuenciación en matrices ordenadas de nanoesferas de ADN (DNB). Se producen las DNB mediante la replicación en círculo rodante de construcciones de bibliotecas circulares, cada una de las cuales contiene un fragmento de un genoma u otro ácido nucleico objetivo de interés, lo que da como resultado un concatémoro de ADN monocatenario lineal que comprende múltiples copias de la construcción circular que colapsa en solución acuosa para formar una estructura compacta en forma de bola. Se disponen las DNB en la superficie de un sustrato plano bidimensional para formar una matriz aleatoria de moléculas individuales. Se pueden fijar directa o indirectamente las DNB a la superficie mediante una variedad de técnicas, incluyendo la unión covalente y la unión no covalente. En algunas realizaciones, se utilizan sustratos estampados con matrices bidimensionales de puntos para producir la matriz DNB. Se activan los puntos para capturar y retener las DNB, mientras que las DNB no permanecen en las áreas entre puntos. En general, una DNB en un lugar repelerá a otras DNB, lo que resultará en una DNB por lugar. Dado que las DNB son tridimensionales (es decir, no son piezas lineales cortas de ADN), las matrices de la invención dan como resultado más copias de ADN por nanómetro cuadrado de superficie de unión que las matrices de ADN tradicionales. Esta calidad tridimensional reduce aún más la cantidad de reactivos de secuenciación necesarios, lo que da como resultado puntos más brillantes y obtención de imágenes más eficientes. La ocupación de las matrices de DNB a menudo supera 90 %, pero puede oscilar de 50 % a 100 % de ocupación. Dado que se disponen las DNB sobre una superficie y luego se adhieren a los puntos activados en estas realizaciones, se "autoensambla" una matriz de DNB de alta densidad esencialmente a partir de las DNB en solución.

Cuando se utilizan dichas matrices de DNB en la secuenciación por síntesis, se pone en contacto la matriz de DNB con un cebador y el cebador se extiende con una base complementaria mediante una polimerasa en cada ciclo de secuenciación. Se revela la identidad del RT incorporado por la polimerasa en cada posición de la matriz como resultado de la unión de un reactivo de afinidad específico a su RT correspondiente. En la secuenciación de cuatro colores, por ejemplo, el resultado es una matriz de DNB, cada uno de los cuales está marcado con un reactivo de afinidad, de modo que la identidad del RT incorporado en una posición particular de la matriz es identificable por el marcador fluorescente (u otro marcador detectable) que forma parte del reactivo de afinidad unido al RT.

En los métodos de SBS que utilizan terminadores reversibles, se inmoviliza un ácido nucleico plantilla en una superficie y se hibrida un cebador oligonucleotídico en una posición predeterminada en la plantilla (es decir, el sitio de unión del cebador). Se incorpora un análogo de nucleótido en el que la desoxirribosa 3'-OH se reemplaza con una unidad estructural de bloqueo eliminable, por ejemplo, 3'-O-azidometilo, se incorpora en el terminal 3' del cebador en una reacción de extensión del cebador. El análogo de nucleótido incorporado es complementario y forma pares de bases con el nucleótido en la posición correspondiente en la plantilla. Convencionalmente, el análogo de nucleótido incluye un marcador detectable que identifica la nucleobase del análogo de nucleótido incorporado y, por lo tanto, también identifica la base del nucleótido complementario en la plantilla. En los métodos de SBS comúnmente utilizados, el análogo de nucleótido incluye un marcador fluorescente unido a la nucleobase mediante un enlazador escindible.

En los métodos de SBS que utilizan terminadores reversibles, después de que se detecta la incorporación del análogo de nucleótido, se elimina el grupo de bloqueo, normalmente química o enzimáticamente, para producir un nucleótido incorporado con un grupo 3'-OH. Se pueden llevar a cabo rondas adicionales de incorporación de análogos de nucleótidos bloqueados en 3', detección y desbloqueo en reacciones adicionales de extensión de cebadores. Si bien en cada ronda de extensión del cebador se agrega un nucleótido, el proceso puede denominarse extensión del cebador, aunque puede ser más preciso decir que el producto de extensión de la ronda anterior (y no el cebador del oligonucleótido original) está extendido. Se puede denominar la cadena de extensión del cebador de varias maneras, incluso como "cadena de ADN en crecimiento (GDS)", "producto de extensión del cebador" o "cebador extendido".

Se apreciará que cuando se añade un dNTP (es decir, un nucleósido trifosfato) al terminal 3' del cebador, se elimina el pirofosfato de manera que se incorpora un nucleósido monofosfato (o nucleótido). Un nucleótido terminador reversible sin marcación o sin marcar puede referirse a cualquier forma (trifosfato de nucleósido libre o monofosfato de nucleótido incorporado), a menos que se especifique lo contrario, como quedará claro por el contexto. Un nucleótido terminador reversible sin marcación o sin marcar puede denominarse NLRT.

En un aspecto de la presente invención, los análogos de dNTP que se incorporan no están marcados de forma detectable. En este contexto, "marcado no detectable" significa que el dNTP incorporado no está conjugado con un tinte que produce una señal detectable (por ejemplo, fluorescente) o una enzima que, en presencia de sustratos, produce una señal detectable (por ejemplo, quimioluminiscente). Como se usa en el presente documento, un "nucleótido terminador reversible" se refiere a un nucleótido de origen natural, o un análogo de nucleótido, en el que se reemplaza la desoxirribosa 3'-OH con una unidad estructural de bloqueo eliminable, por ejemplo, 3'-O-azidometilo.

En un aspecto de la presente invención, en una reacción de secuenciación, se detecta el NLRT incorporada mediante reactivos de afinidad, tales como anticuerpos, que distinguen entre los nucleótidos terminales 3' de los productos de extensión del cebador y, por lo tanto, identifican la nucleobase del nucleótido terminal 3' de la plantilla. En un enfoque, el reactivo de afinidad se une específicamente a un NLRT incorporado con que contiene una base específica (por ejemplo, A, T, G o C), o un análogo de la base específica, con una afinidad mucho mayor que la que se une al NLRT incorporado con las otras bases u otros análogos de bases presentes en la reacción de secuenciación. En otro enfoque, el reactivo de afinidad se une a un NLRT incorporado con que contiene una base específica (por ejemplo, A, T, G o C), o un análogo de la base específica, con una afinidad o eficiencia característica que es diferente de la afinidad o eficiencia con lo que se une a las otras bases, u otros análogos de bases presentes, presentes en la reacción de secuenciación.

De acuerdo con la invención, los reactivos de afinidad también pueden distinguir un NLRT incorporado en el terminal 3' del producto de extensión del cebador de los nucleótidos "internos" incorporados previamente que no están en el terminal 3'. En general, el NLRT en el extremo 3' del producto de extensión del cebador difiere de los nucleótidos incorporados previamente por la presencia de un 3'-OH libre (que en los nucleótidos internos se reemplaza por un enlace fosfodiéster) o la presencia de una unidad estructural de bloqueo 3', así como la accesibilidad diferencial del azúcar y la nucleobase.

De acuerdo con la presente invención, se llevan a cabo las reacciones de SBS utilizando cuatro NLRT con diferentes bases nitrogenadas (por ejemplo, A, T, G y C). En una reacción de SBS, se usan diferentes reactivos de afinidad (por ejemplo, 2, 3 o 4 reactivos de afinidad diferentes), cada uno de los cuales se une a un NLRT con una base nitrogenada específica y no se une a un NLRT con diferentes bases nitrogenadas o, en algunas realizaciones, se une a NLRT con diferentes bases nitrogenadas o grupos de bloqueo no idénticos, pero lo hace con diferentes niveles de eficiencia.

El reactivo de afinidad puede distinguir un NLRT incorporado de un NLRT diferente con base en las diferencias estructurales en la base nitrogenada, el azúcar, el grupo de bloqueo escindible o una combinación de estos elementos. En algunos casos, se distinguen diferentes NLRT debido, por ejemplo, a diferencias estructurales significativas en la base nitrogenada (por ejemplo, adenosina frente a guanina) y/o diferencias estructurales significativas en el grupo de bloqueo (por ejemplo, azidometilo frente a cianoetenilo).

- Además, el reactivo de afinidad puede distinguir un NLRT incorporado de un NLRT diferente basándose en pequeñas diferencias estructurales (por ejemplo, en algunos casos, adición o sustitución de menos de 5 átomos), preferiblemente en combinación con diferencias naturales. Estos pequeños cambios estructurales se pueden realizar en la base nitrogenada, el azúcar y/o el grupo de bloqueo. Se pueden fabricar reactivos de afinidad, tales como anticuerpos, que distinguen diferencias tan pequeñas entre diferentes NLRT.
- De acuerdo con un aspecto de la invención, cada uno de los reactivos de afinidad puede distinguirse de los otros presentes en la reacción de secuenciación (por ejemplo, porque cada uno está marcado de manera diferente) o está unido por diferentes ligantes secundarios.
- De acuerdo con la invención, existen limitaciones en las estructuras de cada base nitrogenada, el azúcar y el grupo de bloqueo escindible.
- Por ejemplo, las bases modificadas adecuadas conservarán la especificidad de unión de Watson-Crick normal y deberían ser compatibles con la incorporación por una ADN polimerasa. En algunas realizaciones, el análogo de base no tiene propiedades fluorescentes (Renatus et al., 2010, Chem Rev. 110(5): 2579-2619).
- De manera similar, se puede modificar la porción de azúcar de los NLRT. Los ácidos nucleicos con dichos NLRT modificados deberían conservar la capacidad de hibridarse con la cadena plantilla y deberían ser compatibles con la incorporación por una ADN polimerasa.
- De manera similar, se pueden usar NLRT con grupos de bloqueo que difieren solo ligeramente. Por ejemplo, se pueden usar 2, 3 o 4 NLRT diferentes.
- En determinadas realizaciones de la invención, un grupo de bloqueo (sin incluir el átomo de oxígeno 3' de desoxirribosa) tiene un peso molecular (MW) inferior a 184, a menudo inferior a 174, a menudo inferior a 164, a menudo inferior a 154, a menudo inferior a 144, a menudo inferior a 134, a menudo inferior a 124, a menudo inferior a 114, a menudo inferior a 104, a menudo inferior a 94 y, a veces, inferior a 84.
- En ciertas realizaciones, los pesos moleculares de los monofosfatos de desoxirribonucleótidos están en el intervalo de aproximadamente 300 a 325 (dAMP 331.2, dCMP 307.2, dGMP 347.2 y dTMP 322.2). En ciertas realizaciones, la unidad estructural NLRT cuando se incorpora en un producto de extensión de cebador (es decir, que incluye el grupo de bloqueo del terminador reversible pero no incluye el pirofosfato del dNTP) tiene un peso molecular inferior a 700, inferior a 600, inferior a 550, a menudo inferior a 540, a menudo inferior a 530, a menudo inferior a 520, a menudo inferior a 510, a menudo inferior a 500, a menudo inferior a 490, a menudo inferior a 480, a menudo inferior a 470 y, a veces, menos de 460.
- En determinadas realizaciones, los métodos de la invención se usan para generar lecturas de secuenciación de más de 1000 nucleótidos, a veces de 10 a 500 nucleótidos, a veces de 10 a 250, a veces de más de 25, a veces de más de 50 nucleótidos. En algunos casos se realiza la secuenciación con menos de un error por 2000 bases, un error por 5000 bases.

11. Ejemplos

11.1 Ejemplo 1. Preparación de antígenos 3'-O-azidometil-2'-dG, -dC, -dA y -dT conjugados.

Síntesis de éster activo de 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina. Se muestra la síntesis del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) reactivo con amino de 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina en la Figura 5. Se añadieron el compuesto G1 (416 mg, 0.708 mmol), DMF anhidro (3 mL) y 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (171 mg, 1.054 mmol) a un matraz de 50 mL. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadieron clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (384 mg, 2.29 mmol) y trietilamina (300 µL, 2.155 mmol). Se agitó la mezcla a 40 °C durante 10 h. Se eliminó la mayor parte de DMF en un evaporador rotatorio (o rotovap) bajo vacío para dar el compuesto crudo G2.

Al compuesto crudo G2, se añadieron EtOH (5 mL) y NaOH/H₂O 1N (7 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante tres días. Se añadió HCl/H₂O 1N para ajustar el pH a 7.4. Se eliminó la mayor parte del EtOH en un rotovap y luego se filtró. Se purificó el filtrado mediante HPLC preparatoria utilizando regulador TEAB 25 mM (bicarbonato de trietilamina, pH 8,0 a temperatura ambiente) y CH₃CN para dar el compuesto G3 (341 mg) como un sólido blanco. LCMS: 452.1 (MS⁺).

En un vial de 5 mL, se añadieron el compuesto G3 (42 mg, 0.076 mmol), dimetilformamida anhidra (DMF) (0.6 mL) y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU) (19 mg, 0.063 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se obtuvo el éster de NHS activado G4 deseado para preparar conjugados biológicos. LCMS: 548 (MS⁺).

Conjugación de 3' -O-azidometil-dG con albúmina de suero bovino (BSA). Se hicieron reaccionar 20 mg de BSA (10 mg/mL) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9,0) con NaCl 150 mM con 5 mg de Compuesto G4. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con

una columna de desalinización (Bio-Gel® P Perlas de poliacrilamida [perlas P6DG], Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofilizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dG con hemocianina de lapa californiana (KLH). Se hicieron reaccionar 20 mg de KLH (10 mg/mL) en regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH = 9.0) con NaCl 150 mM con 7 mg de Compuesto G4. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante una hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofilizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Se muestra la conjugación del éster 3'-O-azidometil-dC-NHS a BSA, KLH y resina de agarosa en la FIGURA 9, usando un método sintético ligeramente diferente al mostrado en la Figura 5 en el que se usa un enlazador diferente.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dG con agarosa activada con amina resina. Se lavaron 20 mL de resina de agarosa activada con amina húmeda (5 μ moles de grupo activado/mL) con 30 mL de regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH = 9.0) y NaCl 150 mM. Se añadieron 70 mg de compuesto G4 a 20 mL de perlas húmedas, se incubó la reacción y se hizo rotar a temperatura ambiente (TA) durante dos horas. Después de la reacción, se lavó la resina con 50 mL de solución salina tamponada con fosfato hasta que la absorbancia de 260 nm fue inferior a 0.02 para dar la resina de purificación deseada.

Síntesis de éster NHS amino reactivo de 3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina (C8). Se muestra la síntesis del éster de NHS reactivo con amino de 3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina (C8) en la Figura 6. Se añadieron el compuesto C5 (410 mg, 1.061 mmol), DMF anhidro (3 mL) y 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (213 mg, 1.314 mmol) a un matraz de 50 mL. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadieron clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (223 mg, 1.330 mmol) y trietilamina (200 μ L, 1.437 mmol). Se agitó la mezcla a 40 °C durante 6 horas. Se eliminó la mayor parte de DMF en un rotovap bajo vacío para dar el compuesto C6 crudo.

Al compuesto bruto C6 se le añadió EtOH (5 mL) y NaOH/H₂O 1N (5 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadió HCl/H₂O 1N para ajustar el pH a 7.4, se eliminó la mayor parte del EtOH en un evaporador rotatorio y luego se filtró la mezcla. Se purificó el filtrado mediante HPLC preparatoria utilizando regulador TEAB 25 mM y CH₃CN para dar el compuesto C7 (518 mg) como un sólido blanco. LCMS: 412.1 (MS⁺).

En un vial de 5 mL, se añadieron el compuesto C7 (49 mg, 0.096 mmol), DMF anhidro (0.8 mL) y TSTU (27 mg, 0.090 mmol). Se agitó a temperatura ambiente la mezcla de reacción durante 1 hora y se obtuvo el éster C8 de NHS activado deseado para preparar conjugados biológicos. LCMS: 509.2 (MS⁺).

Conjugación de 3'-O-azidometil-dC con albúmina de suero bovino (BSA). Se hicieron reaccionar 20 mg de BSA (10 mg/mL) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9.0) con NaCl 150 mM con 5 mg de Compuesto C8. Se llevó a cabo a reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofilizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dC con hemocianina de lapa californiana (KLH). Se hicieron reaccionar 20 mg de KLH (10 mg/mL) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9.0) con NaCl 150 mM con 7 mg de Compuesto C8. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG, Bio-Rad Laboratories, Inc.) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofilizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dC con agarosa activada por amina resina. Se lavaron 20 mL de resina de agarosa activada con amina húmeda (5 μ moles de grupo activado/mL) con 30 mL de regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH = 9.0) y NaCl 150 mM. Se añadieron 70 mg de Compuesto C8 a 20 mL de perlas húmedas, se incubó la reacción y se hizo rotar a TA durante 2 horas. Después de la reacción, se lavó la resina con 50 mL de solución salina tamponada con fosfato hasta que la absorbancia de 260 nm fue inferior a 0.02 para dar la resina de purificación deseada.

Síntesis del éster NHS amino reactivo de 3'-O-azidometil-2'-desoxiadenina (A12). Se muestra la síntesis del éster de NHS reactivo con amino de 3'-O-azidometil-2'-desoxiadenina (A12) en la Figura 7. Se añadieron el compuesto A9 (111 mg, 0.270 mmol), DMF anhidro (1 mL) y 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (70 mg, 0.431 mmol) a un matraz de 25 mL. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (78 mg, 0.465 mmol) y trietilamina (75 μ L, 0.539 mmol). Se agitó la mezcla a 40 °C durante 16 h. Se eliminó la mayor parte de la DMF en un evaporador rotatorio al vacío para dar el compuesto 10 crudo.

Al compuesto crudo A10, se añadieron EtOH (2 mL) y NaOH/H₂O 1N (4 mL). Se agitó la mezcla a 40 °C durante 24 horas. Se añadió HCl/H₂O 1N para ajustar el pH a 8.5, se eliminó la mayor parte del EtOH en un evaporador

rotatorio y se filtró luego la mezcla. Se purificó el filtrado por HPLC preparativa utilizando regulador TEAB 25 mM y CH₃CN para dar el compuesto A11 (107 mg) como un sólido blanco. LCMS: 509.2 (MS⁺).

En un vial de 5 mL, se añadieron el compuesto 11 (61 mg, 0.114 mmol), DMF anhidro (1 mL) y TSTU (20 mg, 0.066 mmol). Se agitó a temperatura ambiente la mezcla de reacción durante 1 hora y se obtuvo el éster A12 de NHS activado deseado para preparar conjugados biológicos. LCMS: 555.2 (MS⁺).

Conjugación de 3'-O-azidometil-dA con albúmina de suero bovino (BSA). Se hicieron reaccionar 20 mg de BSA (10 mg/ml) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9,0) con NaCl 150 mM con 5 mg de Compuesto A12. Se llevó a cabo a reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofolizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dA con hemocianina de lapa californiana (KLH). Se hicieron reaccionar 20 mg de KLH (10 mg/ml) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9,0) con NaCl 150 mM con 7 mg de Compuesto A12. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofolizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dC con agarosa activada por amina resina. Se lavaron 20 mL de resina de agarosa activada con amina húmeda (5 µmoles de grupo activado/ml) con 30 mL de regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH = 9,0) y NaCl 150 mM. Se añadieron 70 mg de compuesto A12 a 20 ml de perlas húmedas, se incubó la reacción y se hizo rotar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, se lavó la resina con 50 mL de solución salina tamponada con fosfato hasta que la absorbancia de 260 nm fue inferior a 002 para dar la resina de purificación deseada.

Síntesis del éster NHS amino reactivo de 3'-O-azidometil-2'-desoxitimina (T16). Se muestra la síntesis del éster NHS reactivo con amino de 3'-O-azidometil-2'-desoxitimina (T16) en la Figura 8. Se añadieron el compuesto T13 (108 mg, 0.363 mmol), DMF anhidro (1 mL) y 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (74 mg, 0.456 mmol) a un matraz de 25 mL. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (80 mg, 0.477 mmol) y trietilamina (75 µL, 0.539 mmol). Se agitó la mezcla a 40 °C durante 6 horas. Se eliminó la mayor parte de DMF en un rotovap bajo vacío para dar el compuesto T14 crudo.

Al compuesto crudo T14, se añadieron EtOH (2 mL) y NaOH/H₂O 1N (2 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió HCl/H₂O 1N para ajustar el pH a 7.5, luego se eliminó la mayor parte del EtOH en un rotovap y luego se filtró la mezcla. Se purificó el filtrado por HPLC preparativa utilizando regulador TEAB 25 mM y CH₃CN para dar el compuesto T15 (286 mg) como un sólido blanco. LCMS: 426.5 (MS⁺).

En un vial de 5 mL, se añadieron el Compuesto 15 (121 mg, 0.225 mmol), DMF anhidra (1 mL) y TSTU (40 mg, 0.132 mmol). Se agitó a temperatura ambiente la mezcla de reacción durante 1 hora y se obtuvo el éster T16 de NHS activado deseado para preparar conjugados biológicos. LCMS: 546.1 (MS+Na⁺).

Conjugación de 3'-O-azidometil-dT con albúmina de suero bovino (BSA). Se hicieron reaccionar 20 mg de BSA (10 mg/ml) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9,0) con NaCl 150 mM con 5 mg de Compuesto T16. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofolizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dT con hemocianina de lapa californiana (KLH). Se hicieron reaccionar 20 mg de KLH (10 mg/ml) en regulador de bicarbonato de Na 50 mM (pH = 9,0) con NaCl 150 mM con 7 mg de Compuesto T16. Se llevó a cabo a reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se purificó la mezcla de reacción con una columna de desalinización (perlas P-6DG) en solución salina tamponada con fosfato. Se liofolizó el conjugado para dar un polvo blanco.

Conjugación de 3'-O-azidometil-dT con agarosa activada por amina resina. Se lavaron 20 mL de resina de agarosa activada con amina húmeda (5 µmoles de grupo activado/ml) con 30 mL de regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH = 9,0) y NaCl 150 mM. Se añadieron 70 mg de Compuesto T16 a 20 ml de perlas húmedas, se incubó la reacción y se hizo rotar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, se lavó la resina con 50 mL de solución salina tamponada con fosfato hasta que la absorbancia de 260 nm fue inferior a 002 para dar la resina de purificación deseada.

11.2 Ejemplo 2. Fabricación de anticuerpos policlonales contra terminadores reversibles sin marcación (NLRT)

Este ejemplo describe el uso de protocolos para la inmunización y el uso de purificación de anticuerpos para producir reactivos para la secuenciación. Este protocolo se ha utilizado para fabricar antisueros policlonales con anticuerpos específicos para NLRT-A, -T, -G y -C con azidometilo como grupo de bloqueo 3'.

Materiales: Se utilizaron los siguientes materiales para inmunizar conejos: 3 mg de antígeno KLH (para inyectar en conejo), 3 mg de antígeno BSA (para titular) y 2-3 ml de antígeno Sepharose (para purificación).

Inmunización de dos conejos: Se inmunizaron conejos con los antígenos KLH descritos en el Ejemplo 1.

En un enfoque, se siguió un programa de inmunización de 70 días: La primera inmunización fue el Día 1; el segundo día de inmunización fue el Día 20; el tercer día de inmunización fue el Día 40; el cuarto Día de inmunización fue el Día 60. Se recogieron 5 ml de suero preinmune antes de la primera inmunización, y se recogió un sangrado de prueba de 5 ml después de la tercera inmunización para el control de calidad. Finalmente, se recogió un total de 100 ml de antisuero de dos conejos después de 10 días de la cuarta inmunización.

Titulación de Anticuerpo policlonal: Se utilizó el siguiente protocolo para controlar las titulaciones:

a) Recubrir cada pocillo de la placa con 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina-BSA a una concentración de 1 ug/por pocillo (100 µl) durante la noche a 4 °C o 2-3 horas a 37 °C.

b) Añadir 100 ul de antisueros diluidos en serie de cuerpos de conejos inmunizados a cada pocillo e incubar durante 30 min a 37 °C.

c) Lavar tres veces con exceso de 1 X PBS.

d) Añadir 100 ul de IgG anti-HRP de conejo conjugada con cabra (1:4000) a cada pocillo e incubar durante 30 min a 37 °C.

e) Lavar tres veces con exceso de PBS 1X.

f) Agregar 100 ul de solución de sustrato ABTS a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 20 min.

g) Leer la placa en A_{405nm}.

Se usó el mismo protocolo para generar antisueros contra 3'-O-azidometil-2'-desoxi-citosina, -adenina y -timina.

Purificación: Se usó el siguiente protocolo para purificar el anticuerpo del suero. Se preparó un Affi-Gel (Bio-Rad) por conjugación de 3'-azidometil-2'-desoxirribo-nucleobase con Sepharose 6B a través de un enlazador de ácido aminocaproico y se llenó una columna de purificación con el Affi-Gel. Se aplicaron antisueros recuperados de uno o dos conejos (hasta 100 ml) en una columna de afinidad de Sepharose 6G inmovilizada con azido-dG, azido-dC, azido-dA o azido-dT. Se obtuvo una alta titulación de anticuerpos policlonales específicos para cada uno de los NLRT 3'-azidometil.

También se utilizaron programas de inmunización de 50 y 90 días para generar anticuerpos policlonales. Por ejemplo, se inmunizaron cuatro conejos con el conjugado de antígeno KLH-3'-azido-2'-desoxiguanosina. El calendario de inmunizaciones fue el siguiente: primera inmunización, día 1; segunda inmunización, día 14; tercera inmunización, día 28; y cuarta inmunización, día 42. Se recogieron 5 ml de suero preinmune antes de la primera inmunización, y se recogió un sangrado de prueba de 5 ml después de la tercera inmunización para el control de calidad. Finalmente, se recogieron 100 ml totales de antisuero de dos conejos después de 10 días de la cuarta inmunización.

11.3 Ejemplo 3. Preparación de una biblioteca de ADN de *E. coli*

Se usaron matrices de nanobolas de ADN (DNB) de una biblioteca de ADN genómico de *E. coli* en los experimentos de secuenciación descritos en los Ejemplos. Se describen los DNB y las matrices de DNB, por ejemplo, en Drmanac et al., 2010, "Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays," Science 327:78-81. Durante la preparación de la muestra, se construyeron bibliotecas circulares a partir de fragmentos de ADN genómico de *E. coli* y se amplificaron las construcciones de la biblioteca mediante amplificación por círculo rodante (RCA) para producir las DNB que comprenden insertos de ADN genómico con sitios de unión de cebadores adyacentes. Se dispusieron las DNB en una celda de flujo de secuenciación de ADN (por ejemplo, una celda de flujo BGISEQ-500 o una celda de flujo BGISEQ-1000) y se llevó a cabo la secuenciación utilizando un BGISEQ-500 (BGI, Shenzhen, China; véase Huang et al., 2017, "A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer" Gigascience 6:1-9) o un BGISEQ-1000 (BGI, Shenzhen, China).

11.4 Ejemplo 4. Uso de anticuerpos policlonales de conejo específicos de dN-azidometilo y anticuerpos secundarios de anticonejo marcados con cabra para detectar NLRT incorporados en una matriz de DNB

En este experimento se usaron anticuerpos derivados de suero producidos contra conjugados KLH de 3'-azidometil-dA, 3'-azidometil-dC, 3'-azidometil-dG o 3'-azidometil-dT como se describe en el Ejemplo 2. Se prepararon cuatro (4) preparaciones de purificación diferentes de anticuerpos anti-NLRT para cada una de las

cuatro bases (es decir, RT-A, RT-C, RT-G y RT-T), lo que dio como resultado dieciséis (16) preparaciones de anticuerpos denominadas A1 -A4, C1-C4, G1-G4 y T1-T4. Se cebaron las matrices DNB que contienen los insertos de ADN genómico *E. coli*, como se describe en el Ejemplo 4, y se extendieron los cebadores utilizando la polimerasa de ADN BG9 (BGI Shenzhen, China), una polimerasa manipulada para incorporar dNTP modificados en 3' y cuatro terminadores reversibles sin marcación con un grupo de bloqueo de 3'-azidometilo. (por ejemplo, 3'-azidometil-dATP, -dCTP, -dGTP y -dTTP). Se aplicaron individualmente las dieciséis (16) preparaciones de anticuerpos a carriles separados en las matrices de DNB a 10 µg/mL y se incubaron a 35 °C durante 5 min (16 incubaciones separadas). Al final de la incubación, se eliminó la matriz de anticuerpos primarios no unidos lavando con regulador de anticuerpos (AbB) (solución salina tamponada con Tris, pH 7,4, BSA al 0,1 % y Tween-20 al 0,05 %) a 35 °C. Luego, se incubó la matriz con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra marcado con AF488 (fragmento Fab) obtenido de Jackson Immune Research (West Grove, PA, EE. UU.) durante 5 min a 35 °C. Se lavó la matriz con AbB para eliminar el anticuerpo secundario no unido y se tomaron imágenes con un sistema de secuenciación BGISEQ-1000. Se apreciará que se espera que cada una de las 16 preparaciones de anticuerpos teñidas con un único anticuerpo primario se una a los NLRT incorporados en aproximadamente 25 % de los sitios de ADN.

Se generaron cuatro carriles de control en las matrices de secuenciación cebando LAS DNB y extendiendo los cebadores usando los cuatro 3'-azidometil dNTP marcados con un fluoróforo unido a la base a través de un enlazador escindible. Los valores de la señal de control que se muestran aquí son para C-AF488.

La TABLA 1 muestra la señal obtenida utilizando la matriz de control y las matrices de anticuerpos. El nivel más alto de señal mediada por anticuerpos se muestra en negrita. Aunque se observó una variación en la intensidad de la señal entre las matrices (dependiendo de la preparación específica de anticuerpo policlonal de conejo utilizada), los resultados muestran que es posible alcanzar o superar la intensidad de la señal de control en concentraciones de anticuerpos relativamente bajas utilizando esta técnica de detección indirecta.

TABLA 1

NLRT-A	señal	NLRT-C	señal
Control	30845.90	Control	30384.00
A1	21268.92	C1	13922.90
A2	39444.35	C2	10901.23
A3	41803.23	C3	27530.57
A4	40488.85	C4	18990.98

NLRT-G	señal	NLRT-T	señal
Control	24367.88	Control	28462.74
G1	14171.97	T1	9163.79
G2	23279.56	T2	17026.13
G3	22748.62	T3	25232.90
G4	19498.47	T4	41832.23

11.5 Ejemplo 5. Secuenciación de ADN utilizando RT-A, -C y -T marcados con fluorescencia y RT-G sin marcar

Se secuenció una biblioteca de ADN genómico de *E. coli* de nanobolas de ADN utilizando RT-A, -C y -T marcados con fluorescencia y RT-G sin marcar, todos con grupos de bloqueo 3'-azidometilo. Se realizó la secuenciación con un secuenciador BGISEQ-500 (BGI, Shenzhen, China) y se analizaron los datos con un informe de análisis de conmutación de bases proporcionado con el secuenciador. Se llevó a cabo la secuenciación durante 5 ciclos (FIGURAS 10A y 10C) o 10 ciclos (FIGURAS 10B y 10D). Las FIGURAS 10A y 10C muestran el valor de Rho. (Los valores de Rho se calculan restando el fondo de las intensidades de señal obtenidas después del análisis de imágenes. También se aplica la normalización de la señal, incluyendo la corrección de diafonía). Las FIGURAS 10B y 10D muestran la relación señal-ruido (SNR).

Los datos, incluyendo el Rho de intensidades y SNS (relación señal-ruido) del informe de conmutación de base exitoso, indican que se puede realizar con éxito la secuenciación con RT sin marcación y reactivos de afinidad marcados que se unen específicamente al RT.

11.6 Ejemplo 6. Secuenciación de ADN usando cuatro RT sin marcar y anticuerpos policlonales anti-NLRT sin marcar

La TABLA 2 ilustra los datos de secuenciación generados usando un secuenciador BGISEQ-1000 (BGI, Shenzhen, China) con matrices de chips de 8 carriles (véase Fehlmann y col., Clin. Epigenetics 8:123, 2016). La columna 5 muestra los resultados utilizando terminadores reversibles sin marcación en los que la unidad estructural de bloqueo escindible es un 3'-O-azidometilo (NLRT-A, -T, -C y -G) y anticuerpos policlonales ("anticuerpos 1°") dirigidos contra cada uno de los cuatro NLRT. Se detectó la unión del anticuerpo usando un anticuerpo 2° (fragmento anticonejoFab de cabra marcado con AF488 obtenido de Jackson Immune Research. Se midió la señal en el canal FIT. En los carriles que no son de control (por ejemplo, TABLA 2, columnas 3-8), cada anticuerpo primario se aplica por separado (es decir, se aplica en un canal separado) y se detecta. Se muestran los valores de señal sin procesar.

Las filas de la TABLA 2 corresponden a un NLRT con un grupo azidometilo escindible en 3' como grupo de bloqueo reversible. Cada fila de la TABLA 2 se relaciona con un dNTP objetivo, y cada columna muestra una prueba contra ese objetivo. Las columnas son las siguientes:

Columna 1: La especificidad y concentración (en µg/mL) del 1° anticuerpo utilizado en la columna 5 (Control positivo 2).

Columnas 2 y 9: Se llevó a cabo la extensión utilizando cuatro dNTP de terminación reversible ("calientes") marcados con fluorescencia (con el tinte fluorescente unido a la base a través de un conector escindible). (Controles positivos para las matrices de ADN).

Columna 3: Se llevó a cabo la extensión utilizando la ADN polimerasa BG9. Los cuatro anticuerpos 1° a una concentración de 100 µg/ml (Control positivo 1).

Columna 4: Se omiten los anticuerpos primarios (control negativo; antecedentes de anticuerpos secundarios únicamente).

Columna 5: Se llevó a cabo la extensión utilizando cuatro (4) NLRT de azidometilo sin marcar. Resultados que muestran la tinción de cada anticuerpo primario utilizado en la concentración de la Columna 1.

Columna 6: Se llevó a cabo la extensión omitiendo el NLRT objetivo, pero incluyendo 3 NLRT no objetivo (control 1 de especificidad de anticuerpo);

Columna 7: Control negativo en el que la base objetivo en el extremo 3' del GDS tiene 3'-OH en lugar de un grupo de bloqueo azidometilo (control 2 de especificidad de anticuerpo).

Columna 8: Control negativo en el que no se utiliza cebador de secuenciación (control 3 de especificidad).

TABLA 2

Secuenciación de datos en BGISEQ-1000 con matrices de chips de 8 líneas									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Mediana a los 50° de valores percentiles en el canal FIT									
T	600	29317	7073	3638	8999	5940	7356	8725	28805
G	50	27592	27781	3507	19959	3681	3774	4050	28611
C	300	28702	11008	3540	22063	4539	4538	4789	28949
A	75	27636	22569	3527	21693	4264	4227	4316	28242

11.7 Ejemplo 7. 50 ciclos de secuenciación en los que se detecta RT-G sin marcación utilizando un anticuerpo primario de conejo anti-RT-G y un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra marcado

Este ejemplo muestra los resultados de cincuenta (50) ciclos de secuenciación por síntesis (SBS) realizados con un secuenciador de ADN BGISEQ-1000 y una biblioteca de DNB genómico de *E. coli*. Se hibridó un cebador de ADN complementario a la secuencia que flanquea el inserto de ADN genómico con la matriz de DNB y se llevó a cabo la extensión del cebador usando terminadores reversibles en 3'-azidometilo (RT-A, -C, -G, -T) a una concentración de 2 µM cada uno. Se marcaron tres de los terminadores reversibles (azidometil-A, -C, -T) con fluorescencia a través de un enlazador escindible unido a la base (usado en una relación de 50 %

marcado/50 % sin marcación) y un terminador reversible (3'-azidometil-dGTP) no estaba marcado. Se llevó a cabo la extensión del cebador a 35 °C durante 2 min usando ADN BG9.

Después de un ciclo de extensión del cebador, se lavó la matriz para eliminar los nucleótidos no incorporados. Se detectó el 3'-azidometil-dG incorporado incubando con anticuerpo primario de conejo anti-3'-azidometil-dG precombinado con un fragmento Fab anti-conejo de cabra marcado con fluorescencia marcado con AF647. Se precombinaron el anticuerpo primario y los anticuerpos secundarios (fragmento Fab) incubándolos juntos durante 15 min a 35 °C. Se incubó este complejo precombinado en la matriz a una concentración primaria de 25 µg/ml y secundaria de 50 µg/ml durante 10 min a 35 °C y se lavó tres veces la matriz para eliminar los anticuerpos no unidos.

Después de la incubación del anticuerpo, se detectaron los tres RT marcadas (RT-A, -C, -T) usando su marcador fluorescente único, y se detectó la base no marcada (RT-G) usando el marcador fluorescente conjugado con el anticuerpo secundario fragmento de anti-conejo. Después de determinar la identidad de la base DNB mediante detección de longitud de onda de fluorescencia, se eliminaron por reducción el enlazador al marcador (RT-A, -C, -T) y el grupo de bloqueo 3' (RT-G, -A, -C, -T) con THPP a 13 mM durante 2 min a 35 °C, lo que permite la regeneración del grupo 3'-OH y la capacidad de extender aún más la cadena de ADN naciente. Se repitió esta serie de pasos (extensión, incubación de anticuerpos, detección y desbloqueo) durante un total de 50 ciclos de identificación de secuencias.

La FIGURA 11A muestra el porcentaje del Contenido de Información de Conmutación de base (BIC). Este gráfico muestra que la identidad de la base no marcada cuando se detecta indirectamente a través del anticuerpo primario de conejo anti-3'-azidometil-dG precombinado con el anticuerpo secundario de fragmento marcado con fluorescencia AF647 anti-conejo proporciona información suficiente para el análisis de conmutación de base y la identificación de los residuos de ADN desconocido.

La FIGURA 11B muestra las intensidades y tendencias de la señal para cada uno de los marcadores fluorescentes únicos. Se usaron tres nucleótidos (dATP, dCTP, dTTP) que contenían un enlazador escindible marcado con fluorescencia unido a la base en una relación de 50% marcado/50% sin marcación y corresponden a Cy3, FITC y TxR respectivamente. Se detectó el 3'-azidometil-dGTP sin marcación mediante el anticuerpo primario de conejo anti-3'-azidometil-dG precombinado con el anticuerpo secundario de fragmento marcado con fluorescencia AF647 anti-conejo. Estos datos muestran que la tasa de degradación de la intensidad de la señal para la base 3'-azidometil-dG no marcada es menor que la de los nucleótidos marcados con el enlazador escindible. Esta degradación reducida de la intensidad de la señal indica que pueden ser posibles lecturas más largas usando esta técnica que los métodos convencionales que usan dNTPs marcados usando un enlazador escindible.

11.8 Ejemplo 8. Los anticuerpos se unen al NLRT con suficiente especificidad para generar valores de relación señal-ruido (SNR) adecuados para el análisis de llamadas base

Los datos de las TABLAS 3, 4, 5 y 6 muestran los valores de señal superior, Rho (señal restada de fondo y diafonía), señal de fondo ("retroceso") y relación señal-ruido (SNR) obtenidos con la tinción de terminadores reversibles sin marcación en ADN genómico de *E. coli* usando anticuerpos anti-azidometil-base marcados directamente y para matrices de control usando azidometil-bases marcadas. Se realizó el experimento en una matriz de celdas de flujo BGISEQ-500 con una biblioteca de ADN genómico de *E. coli* y escaneado en un secuenciador de ADN BGISEQ-500.

Los valores de control son los resultados de la secuenciación utilizando cuatro RT de 3'-azidometil marcados (marcadores conectados a la base a través de un enlazador escindible). Se usaron RT de 3'-azidometil en una relación de 60 % marcado ("caliente"), 40 % sin marcar ("frío") en las TABLAS 4, 5 y 6 y 25 % marcado y 75 % sin marcar en la TABLA 3.

Se escanearon los valores previos a la tinción después de una ronda de extensión del cebador, pero antes de la adición del anticuerpo.

Se obtuvieron los valores teñidos escaneando después de la incubación (2 × 2 min a 35 °C) con los anticuerpos anti-azidometil-base apropiados a las concentraciones indicadas. Se marcaron los anticuerpos anti-azidometil-base directamente con el fluoróforo mostrado. Los valores correspondientes a la unión anti-azidometil-base están en negrita.

La TABLA 3 muestra los resultados usando anticuerpos policlonales contra 3'-O-azidometil-2'-desoxiadena. La TABLA 4 muestra los resultados usando anticuerpos policlonales contra 3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina. La TABLA 5 muestra los resultados usando anticuerpos policlonales contra 3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina. La TABLA 6 muestra los resultados usando anticuerpos policlonales contra 3'-O-azidometil-2'-desoxitimidina.

TABLA 3

ES 3 026 859 T3

	N3A			
	Valores de control (25 % caliente)			
	A	C	G	T
Parte superior	3735	1801	1358	3139
Rho	2771	1542	1149	2894
parte trasera	330	424	275	440
SNR	8	7.3	7.9	9.5
	Incorporación 100% azido A en frío			
	valores de pretinción:			
	A	C	G	T
Parte superior	312	1833	1339	2948
Rho	263	1671	1160	1116
parte trasera	174	513	370	372
SNR	1.8	7.1	5.1	1.7
	teñido con anti-N3A-AF532 (F/P 4.8) a 75ug/mL			
	A	C	G	T
Parte superior	2185	1687	1295	3252
Rho	1896	1512	1147	3112
parte trasera	498	476	339	581
SNR	6.7	7	5.9	9.3

TABLA 4

	N3C			
	Valores de control (60% caliente)			
	A	C	G	T
Parte superior	13341	4541	5077	7646
Rho	10449	3618	4006	6344
parte trasera	153	460	422	468
SNR	13.5	11.1	11	11.4
	Incorporación 100% azido C en frío			
	valores de pretinción:			
	A	C	G	T

ES 3 026 859 T3

Parte superior	12596	3104	4419	7960
Rho	8688	930	1050	5055
parte trasera	122	384	322	512
SNR	9.5	3	2.8	7.4
teñido con anti-N3C-IF700 (F/P 4.6) a 400ug/mL				
	A	C	G	T
Parte superior	13844	4454	4161	7924
Rho	10635	4028	3232	6504
parte trasera	7	1082	460	438
SNR	13.9	9.5	11.6	12.4

TABLA 5

	N3G			
	Valores de control (60% caliente)			
	A	C	G	T
Parte superior	13441	4541	5077	7646
Rho	10449	3618	4006	6344
parte trasera	153	460	422	468
SNR	13.5	11.1	11	11.4
	A	C	G	T
Parte superior	12251	2693	681	6911
Rho	7893	1709	551	4903
parte trasera	492	286	131	742
SNR	6.2	9.5	2.2	8
teñido con anti-N3G-AF647(F/P 3.5) a 25ug/mL				
	A	C	G	T
Parte superior	13831	2921	2759	7278
Rho	11133	2208	2028	6437
parte trasera	441	444	297	689
SNR	12.2	7.5	8.9	12.3

TABLA 6

	N3T			
	Valores de control (60% caliente)			
	A	C	G	T
Parte superior	13341	4541	5077	7646
Rho	10449	3618	4006	6344
parte trasera	153	460	422	468
SNR	13.5	11.1	11	11.4
	Incorporación 100% azido T en frío			
	valores de pretinción:			
	A	C	G	T
Parte superior	7121	3258	2727	3926
Rho	1765	2884	2235	686
parte trasera	190	665	638	241
SNR	2.95	8.6	5.1	1.8
	teñido con anti-N3T-ROXtra(F/P 2.2) 600ug/mL			
	A	C	G	T
Parte superior	6698	2658	2506	4237
Rho	4782	2329	2279	2419
parte trasera	256	613	571	498
SNR	9.6	6.6	6.3	5.3

11.9 Ejemplo 9. Secuenciación de 25 ciclos con anticuerpos policlonales anti NLRT marcados

- Se preparó una biblioteca de ADN genómico de E. coli como se describe en el Ejemplo 2 y se dispuso en una celda de flujo BGISEQ-500. Se añadieron los cebadores y se realizó la secuenciación por síntesis mediante la extensión del cebador utilizando terminadores reversibles de 3'-azidometilo de nucleótido sin marcación (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Los dNTP bloqueados en 3' sin marcación estaban presentes en una concentración de 1 μ M cada uno y se incorporaron usando ADN BG9 a 55 °C durante 1 min por ciclo. Después de la incorporación y el lavado para eliminar los nucleótidos no incorporados, se detectaron los cuatro nucleótidos de base 3'-azidometilo poniendo en contacto la matriz con una mezcla de cuatro anticuerpos anti-3'-azidometilbase marcados directamente en las concentraciones que se muestran en la TABLA 11 (intervalo de 10 -100 μ g/mL) y se incubaron en la matriz a 35 °C 2 $\times$ 2 min por ciclo. "2 $\times$ 2" se refiere a la incubación con anticuerpo durante dos minutos, seguida de una incubación adicional de 2 minutos después de agregar anticuerpo adicional. Se levó tres veces la matriz para eliminar los anticuerpos no unidos. La TABLA 7 muestra la identidad del fluoróforo conjugado directamente con cada anticuerpo de detección.

TABLA 7

Especificidad del anticuerpo policlonal de conejo	Tinte fluorescente	
3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina	Cy5	

3'-O-azidometil-2'-desoxiadenina	AF532	Invitrogen
3'-O-azidometil-2'-desoxicitosina	IF700	AAT Biobúsqueda
3'-O-azidometil-2'-desoxitimina	6-ROXtra™	AAT Biobúsqueda

Se determinó la señal de fluorescencia en cada posición de la matriz DNB escaneando durante 80 ms durante la excitación láser del fluoróforo. Después de determinar la identidad de la base DNB, se eliminó el grupo de bloqueo 3' por reducción con THPP (13 mM) durante 2 min a 35 °C, lo que permitió la regeneración del grupo 3'-OH y permitió una mayor extensión de la cadena de ADN naciente. La eliminación del grupo de bloqueo 3' también dio como resultado la disociación del anticuerpo del producto de extensión del cebador.

Se repitió esta serie de pasos (extensión, incubación de anticuerpos, detección y desbloqueo) durante un total de 25 ciclos de identidad de secuencia de ADN.

Las FIGURAS 12A y 12B muestran el Rho y la relación señal/ruido (SNR) para cada base en cada ciclo de secuenciación. La TABLA 8 muestra la cantidad de las DNB leídas, así como las tasas de mapeo y error en comparación con un genoma *E. coli* de referencia.

Estos datos, incluido el Rho de intensidades y la SNR del exitoso informe de conmutación de bases, demuestran que se pueden llevar a cabo múltiples ciclos de secuenciación de ADN utilizando terminadores reversibles sin marcación y anticuerpos que se unen al grupo de bloqueo y la base.

TABLA 8

Lecturas totales (M)	0.57
>Q30%	73.84
Rata de mapeo%	88.3
Rata de error promedio%	1.58

11.10 Ejemplo 10: Conjuntos de anticuerpos marcados de forma diferente dan resultados comparables

Las TABLAS 9 y 10 muestran (señal superior), Rho (señal sustraída de fondo y diafonía), señal de fondo y valores de relación señal-ruido (SNR) obtenidos con la tinción de terminadores reversibles sin marcación en ADN genómico de *E. coli* usando anticuerpos anti-azidometil-base marcados directamente. Se realizó este experimento en una matriz de celdas de flujo BGISEQ-500 con una biblioteca de ADN genómico de *E. coli* y escaneado en un secuenciador de ADN BGISEQ-500. Se hibridaron los cebadores en las DNB inmovilizadas y se extendieron en presencia de los cuatro nucleótidos 3'-azidometil RT sin marcación (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 1 µM cada concentración durante 2 min a 35 °C usando polimerasa BG9. Después de la incorporación y el lavado para eliminar los nucleótidos no incorporados, se detectaron simultáneamente los nucleótidos de base 3'-azidometil incorporados mediante la incubación de los cuatro anticuerpos anti-3'-azidometil base marcados (Conjunto 1 de anticuerpos) a las concentraciones que se muestran (por ejemplo, "@30 " significa 30 µg/mL) para dos incubaciones secuenciales de dos minutos cada una a 35°C.

Como segunda matriz, se probó utilizando un Conjunto 2 de anticuerpos. El Conjunto 2 de anticuerpos comprende las mismas preparaciones de anticuerpos, pero los anticuerpos están marcados de manera diferente. La TABLA 10 muestra la señal después de aplicar el Conjunto 2 de anticuerpos. Los datos demuestran que los valores de señal y SNR son adecuados para el análisis de llamadas de base independientemente de la identidad del fluoróforo marcado directamente.

TABLA 9

Teñido con el Conjunto 1 de anticuerpos y el Conjunto 1 de colores				
	A @ 30*	C @ 80	G @ 30	T @ 50
	AF532	IF700	Cy5	RoxTra
Parte superior	4567	2538	2698	3545

Rho	3721	1867	1905	3335
parte trasera	353	417	215	432
SNR	12.8	8.8	12	12.8
*Especificidad y concentración de anticuerpos (mg/mL)				

TABLA 10

Teñido con el Conjunto 2 de anticuerpos y el Conjunto 2 de colores				
	G @ 30	T @ 50	A @ 30	C @ 80
	AF532	IF700	Cy5	RoxTra
Parte superior	4954	1712	1647	4348
Rho	4004	1395	1165	3844
parte trasera	305	320	162	414
SNR	13.5	11.5	12.7	14.8

11.11 Ejemplo 11: Eliminación del anticuerpo anti-NLRT sin eliminar el grupo de bloqueo 3'

- 5 Como se analiza en otra parte del presente documento, se puede desacoplar la eliminación de anticuerpos (disociación del producto de extensión del cebador) de la escisión y eliminación del grupo bloqueador 3'. La TABLA 11 muestra los resultados de un experimento en el que se eliminó el anticuerpo por competencia específica. Se realizó la extensión del cebador en una matriz de DNB que comprende una biblioteca de E. coli
- 10 utilizando cuatro nucleótidos de base 3'-azidometil no marcados. La tinción consistía en incubar simultáneamente los cuatro anticuerpos anti-3'-azidometil-base marcados directamente con los fluoróforos Conjunto 1 de color (véase Ejemplo 10). Se utilizó competencia específica para eliminar los reactivos de afinidad de detección mediante incubación en presencia de antígeno libre 20 μ M (3'-O-azidometil-2'-desoxiguanina, desoxiadenina, desoxicitosina, desoxitimina, cada uno en forma de trifosfato) a 57 °C durante
- 15 2 min en WB1 al 50 %, tampón Ab al 50 %. El procedimiento de eliminación de Ab fue (1) WB1, 55 °C; (2) solución de eliminación; (3) WB1, 20 °C; (4) WB2; (5) SRE. WB1: NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M, Tween 20 0.05 %, pH 7. WB2 NaCl 0; 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH9, Tween 20 0.05 %, EDTA 1 mM. pH 9.0; SRE NaCl 400 mM, Tris HCl 1000 mM pH7, L-ascorbato de sodio 100 mM, Tween 20 0.05 %, pH 7.0.

Los datos muestran que la señal y la SNR se reducen significativamente, lo que indica la eliminación de la mayoría de los reactivos de detección de afinidad de la matriz de DNB.

TABLA 11

Anticuerpo marcado eliminado				
Antes de la eliminación de anticuerpos:				
	G-AF532	T-IF700	A-Cy5	C-ROXtra
Parte superior	2577	1708	1557	2274
Rho	2071	1396	1154	1987
parte trasera	234	407	243	340
SNR	12.1	7.9	7.8	11.7

Después de la eliminación de anticuerpos				
	G-AF532	T-IF700	A-Cy5	C-ROXtra
Parte superior	355	577	419	511
Rho	383	516	321	529
parte trasera	191	302	153	272
SNR	3.2	2.1	2.2	2.9

11.12 Ejemplo 12: Eliminación de anticuerpos anti-NLRT y resondeo en múltiples ciclos de secuenciación

El Ejemplo describe un proceso en el que (1) se determina la identidad de una base en una primera posición detectando la unión por un primer anticuerpo primario específico para la base y el grupo de bloqueo 3'; (2) elimina el primer anticuerpo primario sin eliminar el grupo de bloqueo 3'; (3) resondea la misma posición usando un segundo anticuerpo primario específico para la base y el grupo de bloqueo 3'. Los resultados de estos experimentos se resumen en la TABLA 12.

La TABLA 12 ilustra una rata de mapeo de identidad de secuencia de ADN mejorada cuando se combinan dos lecturas independientes de diferentes combinaciones de colores fluorescentes (como se describe en el Ejemplo 10) para cada posición de la cadena de secuenciación por síntesis naciente para un total de 20 posiciones de lectura. "Odd indep" representa la lectura inicial en "colores convencionales" para cada posición de secuencia. "Even indep" representa la lectura posterior en "colores alternos" después de la eliminación por competencia específica utilizando el procedimiento descrito en la TABLA 12. "Combo" representa el resultado de comparar cada una de las dos lecturas independientes y ponderar el resultado con la intensidad más alta y, por lo tanto, el valor de confianza más alto de las dos lecturas. Los resultados muestran ratas de mapeo significativamente más altas y ratas de desajuste significativamente más bajas cuando las dos lecturas independientes se combinan usando esta técnica.

TABLA 12

	Even Indep	Odd Indep	Even gana a Combo	Odd gana a Combo
Número de mutaciones puntuales	26921.06	10992.38	7023.389	6535.383
Número de indeles	220.3288	50.29348	41.78804	40.59239
Rata de mapeo	82.78 %	95.23 %	96.30 %	96.36 %
Longitud de lectura total (rendimiento de mapeo)	604945.5	695260.7	702350.5	702764.2
Longitud de lectura promedio	20	20	20	20
Conteo Dnb de entrada	36452.47	36452.47	36452.47	36452.47
Recuento Dnb mapeado	30247.28	34763.04	35117.53	35138.21
Rata de desajuste	4.52 %	1.67 %	1.02 %	0.95 %
Recuento de mapeo de forma única	28985.11	33533.36	33899.15	33922.32
Rata de discrepancia mapeada de forma única	4.47 %	1.65 %	1.01 %	0.94 %
Proporción indele	0.04 %	0.01 %	0.01 %	0.01 %
Porcentaje de rendimiento concordante	95.45 %	98.33 %	98.97 %	99.04 %

ES 3 026 859 T3

Rendimiento concordante (pb)	577804.2	684218	695285.4	696188.3
------------------------------	----------	--------	----------	----------

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una nucleobase de un nucleótido 3' terminal de un producto de extensión del cebador que comprende
 - (a) combinar (i) el producto de extensión del cebador y (ii) un primer reactivo de afinidad que se une al nucleótido 3' terminal,
 - (b) detectar la unión del primer reactivo de afinidad al nucleótido 3' terminal,
 en el que el primer reactivo de afinidad distingue el nucleótido 3' terminal de los nucleótidos internos del producto de extensión del cebador (i) basándose en la presencia de un grupo 3'-OH libre en el nucleótido 3' terminal o (ii) basándose en la presencia de un grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido 3' terminal, y
- 10 en el que la unión del primer reactivo de afinidad identifica la nucleobase asociada al nucleótido 3' terminal.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el nucleótido 3' terminal es un nucleótido terminador reversible no marcado (NLRT) incorporado que comprende un grupo bloqueador 3'-O-reversible, en el que, en la parte (b)(i), el grupo 3'-OH libre en el nucleótido 3' terminal se genera por escisión del nucleótido terminador reversible no marcado (NLRT) incorporado.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el primer reactivo de afinidad distingue el nucleótido 3' terminal de los nucleótidos internos del producto de extensión del cebador basándose en la presencia de un grupo 3'-OH libre en el nucleótido 3' terminal.
4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el primer reactivo de afinidad distingue el nucleótido 3' terminal de los nucleótidos internos del producto de extensión del cebador basándose en la presencia de un grupo bloqueador 3'-O en el nucleótido 3' terminal.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer reactivo de afinidad discrimina
 - a) un nucleótido 3' terminal que comprende adenina (A) de un nucleótido 3' terminal que comprende guanina (G), timina (T) o citosina (C); o
 - b) un nucleótido 3' terminal que comprende G de un nucleótido 3' terminal que comprende T, C o A; o
 - 25 c) un nucleótido 3' terminal que comprende T de un nucleótido 3' terminal que comprende G, C o A; o
 - d) un nucleótido 3' terminal que comprende C de un nucleótido 3' terminal que comprende G, T o A.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el primer reactivo de afinidad
 - i) reconoce una nucleobase seleccionada entre adenina, guanina, timina y citosina;
 - ii) reconoce un análogo de nucleobase seleccionado entre un análogo de adenina, un análogo de guanina, un análogo de timina y un análogo de citosina; o
 - 30 iii) reconoce un grupo bloqueador 3'-O asociado a una nucleobase específica.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el primer reactivo de afinidad reconoce un análogo de nucleobase, y el análogo de nucleobase se selecciona entre un análogo de adenina con un peso molecular no superior a 235, un análogo de guanina con un peso molecular no superior a 251, un análogo de timina con un peso molecular no superior a 226 y un análogo de citosina con un peso molecular no superior a 211.
- 35 8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que

el primer reactivo de afinidad está conjugado a o unido a un marcador detectable, y el paso de detectar la unión del primer reactivo de afinidad al nucleótido 3' terminal comprende detectar una señal del marcador detectable, en el que la señal es opcionalmente fluorescencia o quimioluminiscencia,
- 40 o

el primer reactivo de afinidad no está marcado y el paso de detectar la unión del primer reactivo de afinidad al nucleótido 3' terminal comprende (i) unir un reactivo de afinidad secundario al primer reactivo de afinidad, en el que el reactivo de afinidad secundario comprende un marcador detectable, y (ii) detectar una señal del marcador detectable del segundo reactivo de afinidad, en el que la señal es opcionalmente fluorescencia o quimioluminiscencia.
- 45 9. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el grupo bloqueador 3'-O o el grupo bloqueador 3'-O-reversible se selecciona del grupo que consiste en alilo, azidometilo, aminoalcoxilo, 2-cianoetilo, alquilo

- sustituido, alquilo no sustituido, alquenilo sustituido, alquenilo no sustituido, alquinilo sustituido, alquinilo no sustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo no sustituido, heteroalquenilo sustituido, heteroalquenilo no sustituido, heteroalquinilo sustituido, heteroalquinilo no sustituido, alenilo, cis-cianoetenilo, trans-cianoetenilo, cis-cianofluoroetenilo, trans-cianofluoroetenilo, cis-trifluorometilenilo, trans-trifluorometilenilo, biscianoetenilo, bisfluoroetenilo, cis-propenilo, transpropenilo, nitroetenilo, acetoetenilo, metilcarbonoetenilo, amidoetenilo, metilsulfonoetenilo, metilsulfonoetilo, formimidato, formhidroximato, viniloetenilo, etilenoetenilo, cianoetilenilo, nitroetilenilo, amidoetilenilo, amino, cianoetenilo, cianoetilo, alcoxi, acilo, metoximetilo, aminoxilo, carbonilo, nitrobencilo, cumarinanilo y nitronaftalenilo.
- 5 10. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el primer reactivo de afinidad es un anticuerpo.
- 10 11. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el primer reactivo de afinidad es un aptámero.
12. El método de la reivindicación 1, en el que el producto de extensión del cebador se hace mediante un proceso que comprende:
- (i) proporcionar un ácido nucleico plantilla inmovilizado,
- 15 (ii) hibridar un cebador oligonucleotídico con el ácido nucleico plantilla inmovilizado, en el que el cebador oligonucleotídico hibrida con una posición predeterminada en el ácido nucleico plantilla,
- (iii) combinar el ácido nucleico plantilla inmovilizado y el cebador hibridado con el mismo con una polimerasa y cuatro nucleótidos terminadores reversibles diferentes, en el que al menos un nucleótido terminador reversible es un terminador reversible no marcado (NLRT)
- 20 en condiciones en las que el cebador oligonucleotídico se extiende en una reacción de extensión del cebador, en el que el NLRT se incorpora como el nucleótido 3' terminal cuando el NLRT es complementario a un nucleótido en la posición correspondiente del ácido nucleico plantilla inmovilizado, generando así el producto de extensión del cebador.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el ácido nucleico plantilla inmovilizado es una nanobola de ADN o un amplicón en un grupo clonal de moléculas plantilla.
- 25 14. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de extensión del cebador se combina con 2, 3 o 4 primeros reactivos de afinidad con diferentes especificidades de unión, y solo uno de los primeros reactivos de afinidad se une al nucleótido 3' terminal.
15. El método de la reivindicación 12, en el que todos los cuatro nucleótidos terminadores reversibles diferentes son terminadores reversibles no marcados (NLRT).
- 30 16. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la eliminación del primer reactivo de afinidad unido al nucleótido 3' terminal.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, en el que el primer reactivo de afinidad se elimina sin eliminar el grupo bloqueador 3'-O.
- 35 18. El método de la reivindicación 17, en el que el nucleótido 3'-terminal es recebado poniendo en contacto el nucleótido 3'-terminal con el mismo primer reactivo de afinidad o un reactivo de afinidad diferente.
19. El método de la reivindicación 18, en el que el primer reactivo de afinidad que fue eliminado es un anticuerpo primario y el reactivo de afinidad utilizado para recebar es el mismo anticuerpo primario.
20. El método de la reivindicación 17, en el que se eliminan tanto el primer reactivo de afinidad como el grupo bloqueador 3'-O del nucleótido 3'-terminal.
- 40 21. El método de la reivindicación 19, en el que el grupo bloqueador 3'-O y el primer reactivo de afinidad se eliminan en el mismo paso.

FIGURA 1

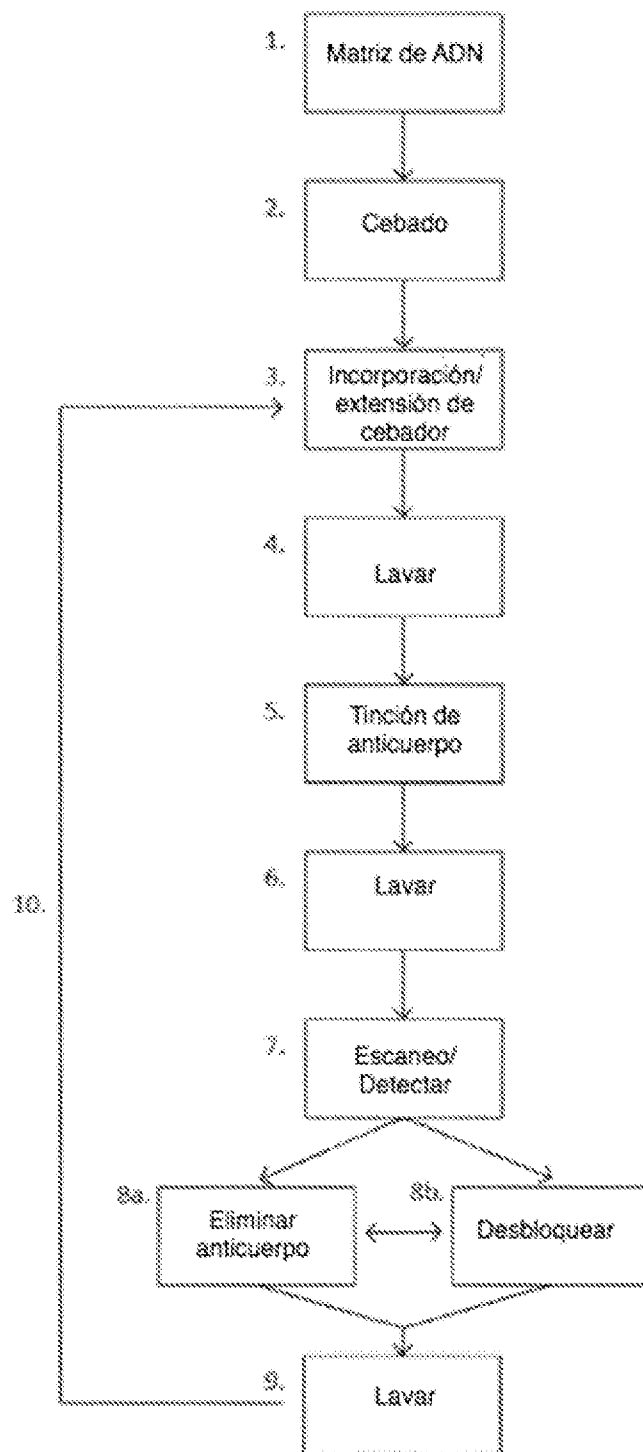


FIGURA 2

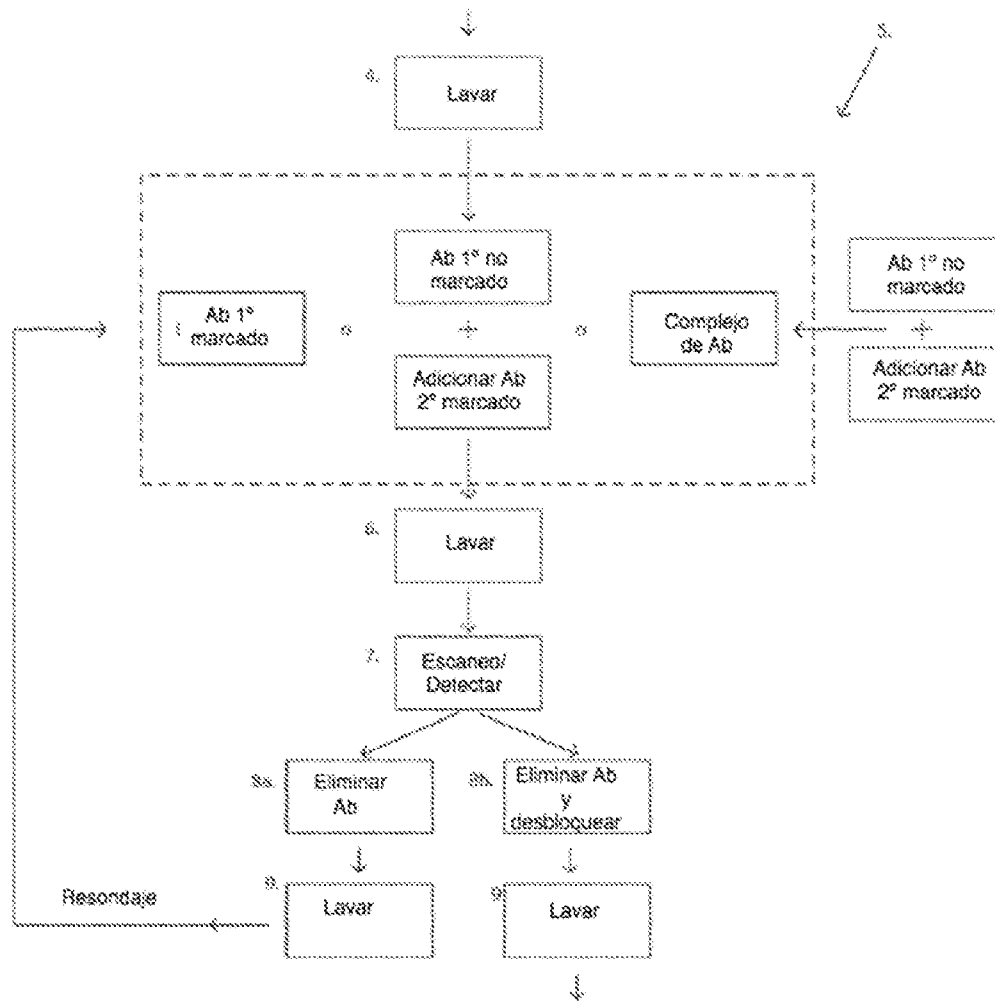


FIGURA 3

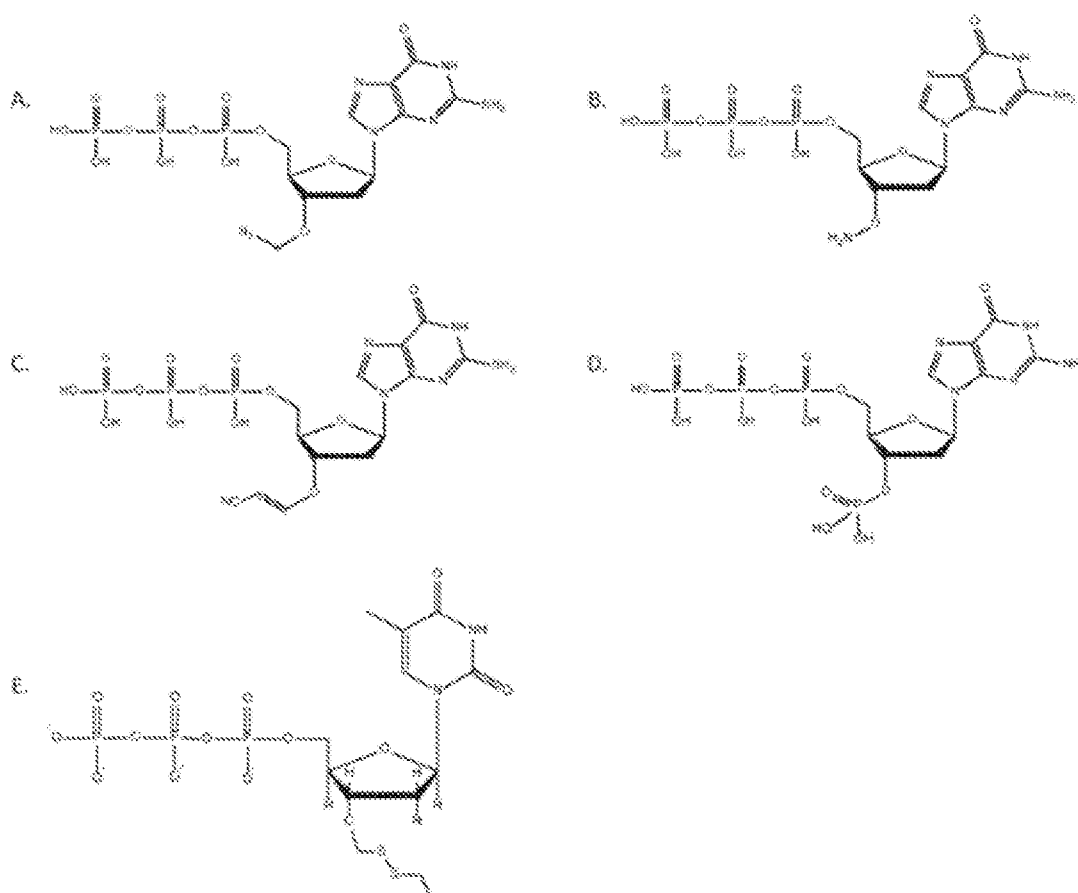


FIGURA 4

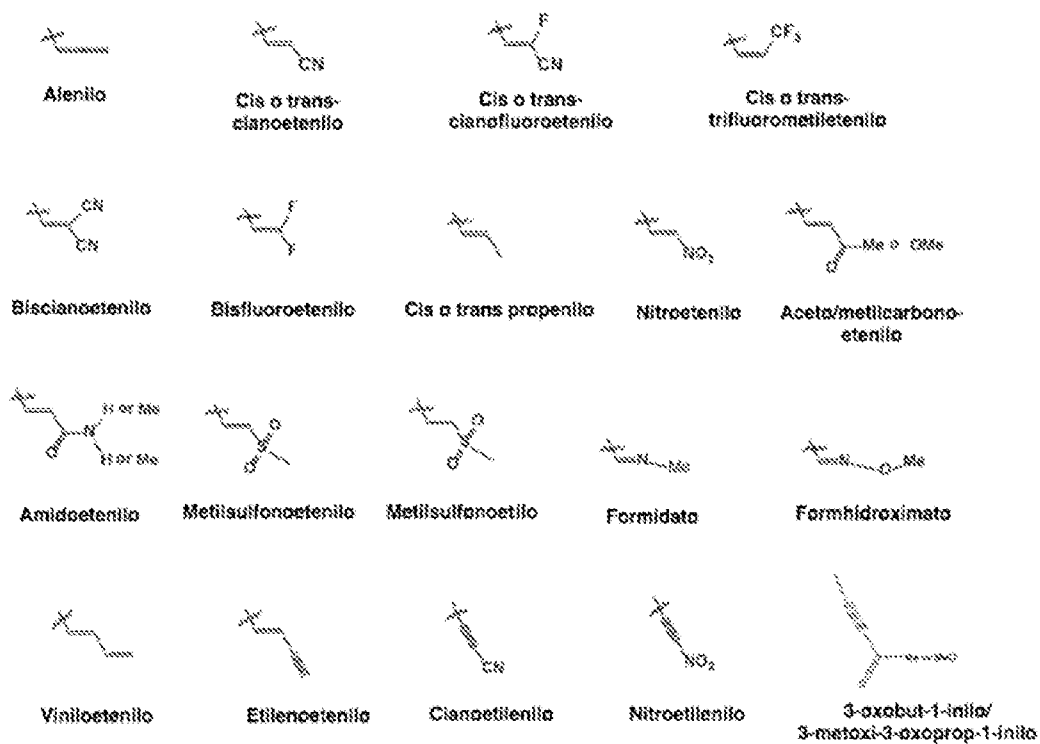


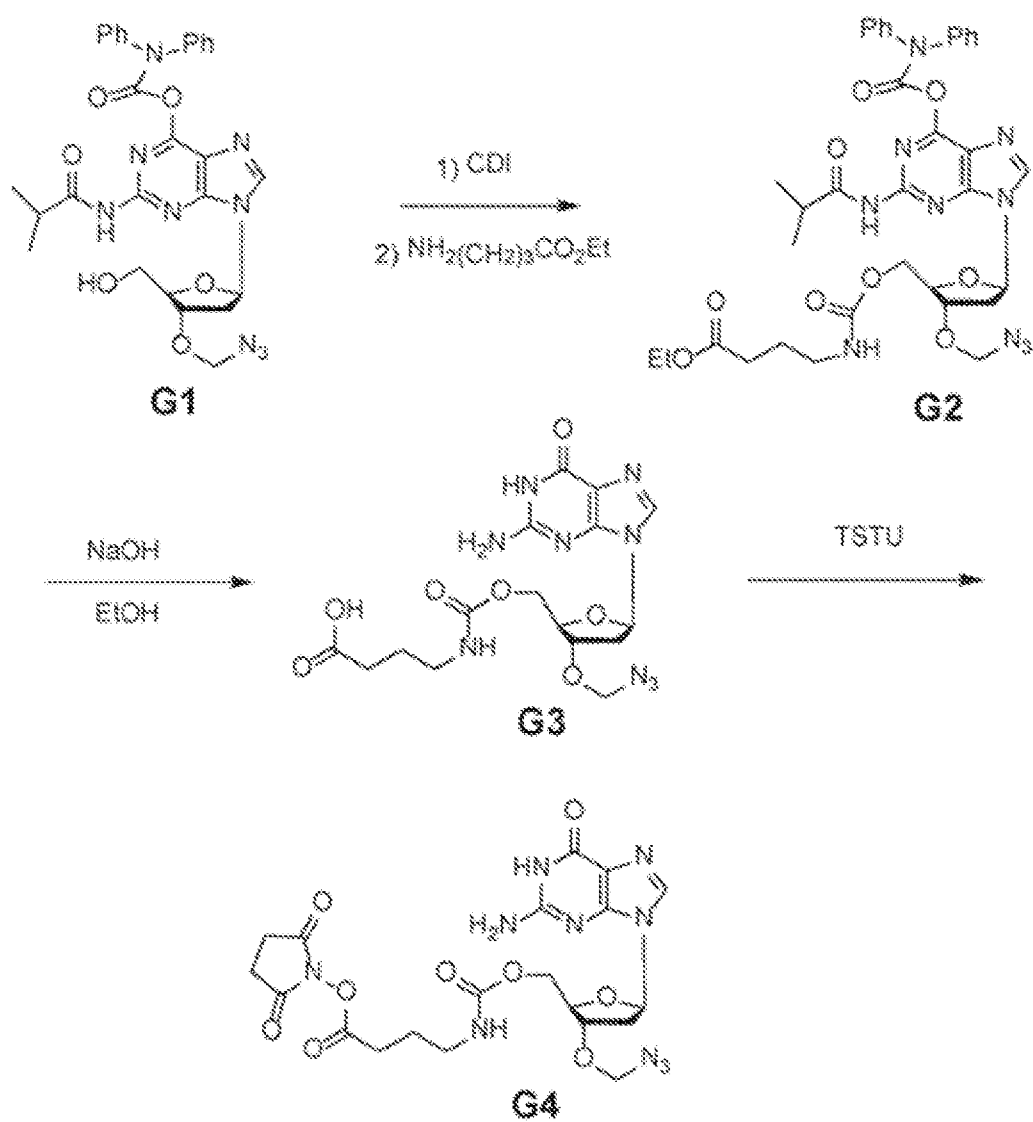
FIGURA 5

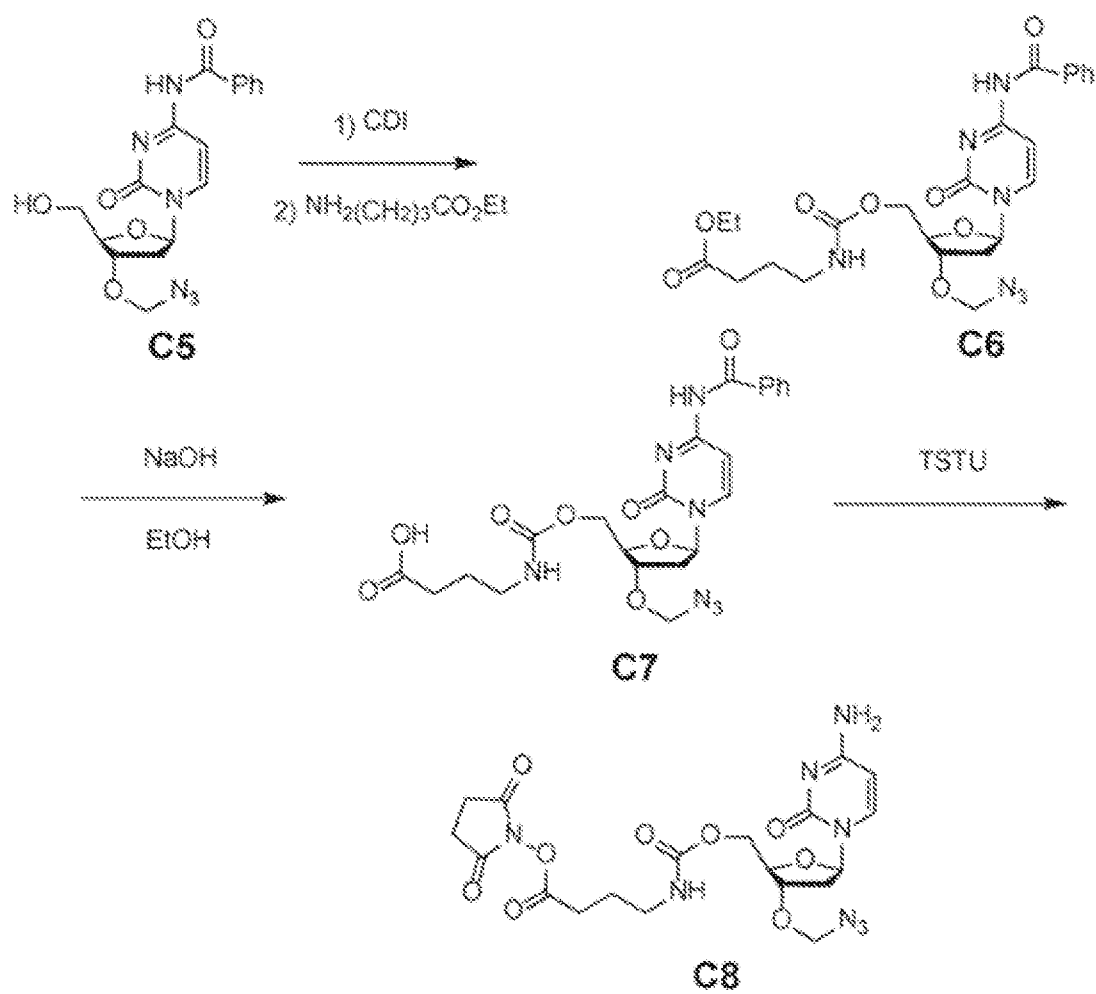
FIGURA 6

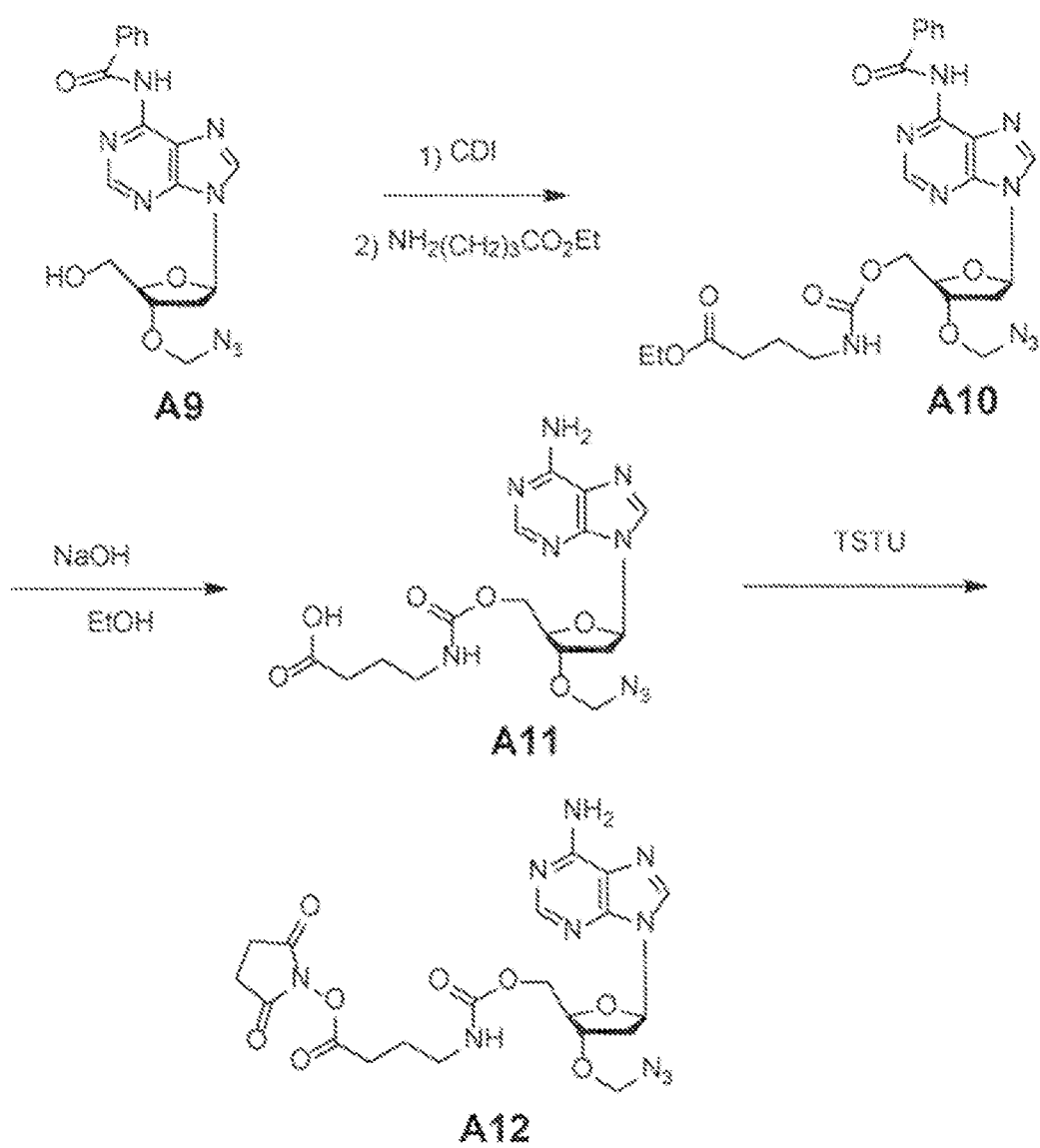
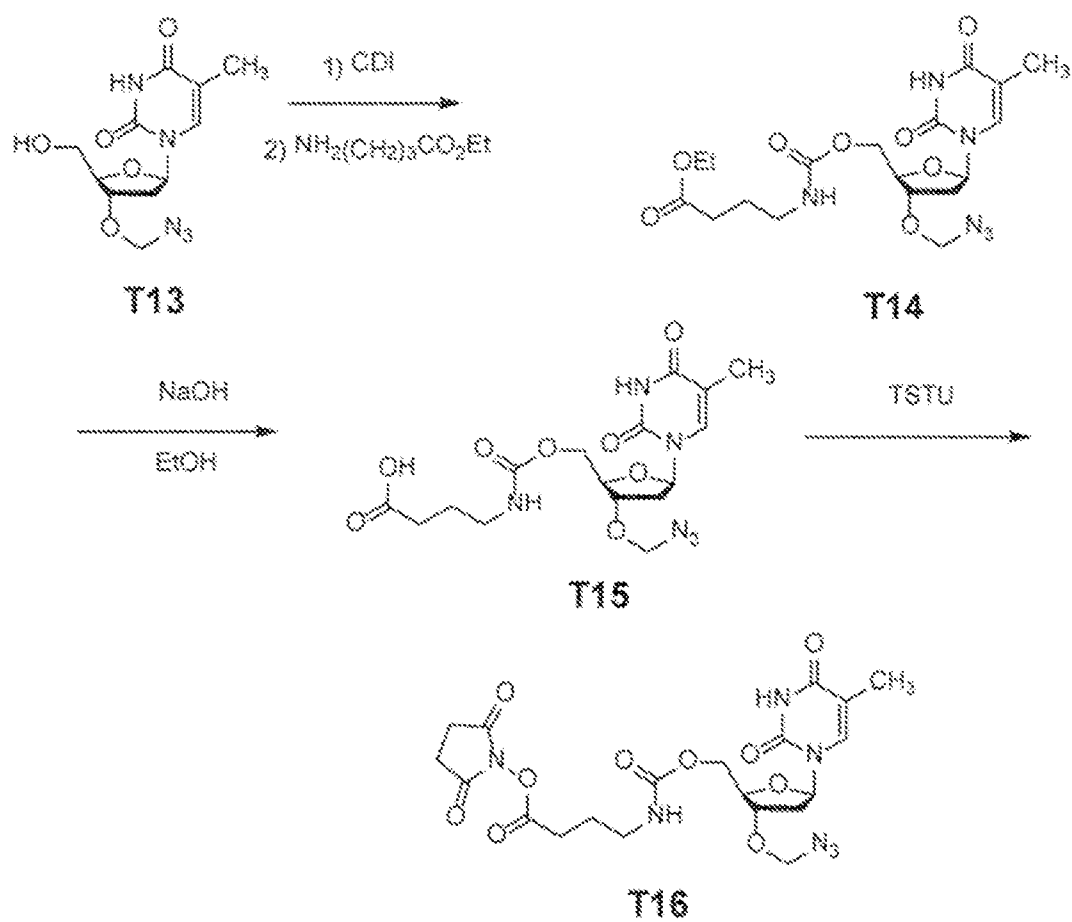
FIGURA 7

FIGURA 8



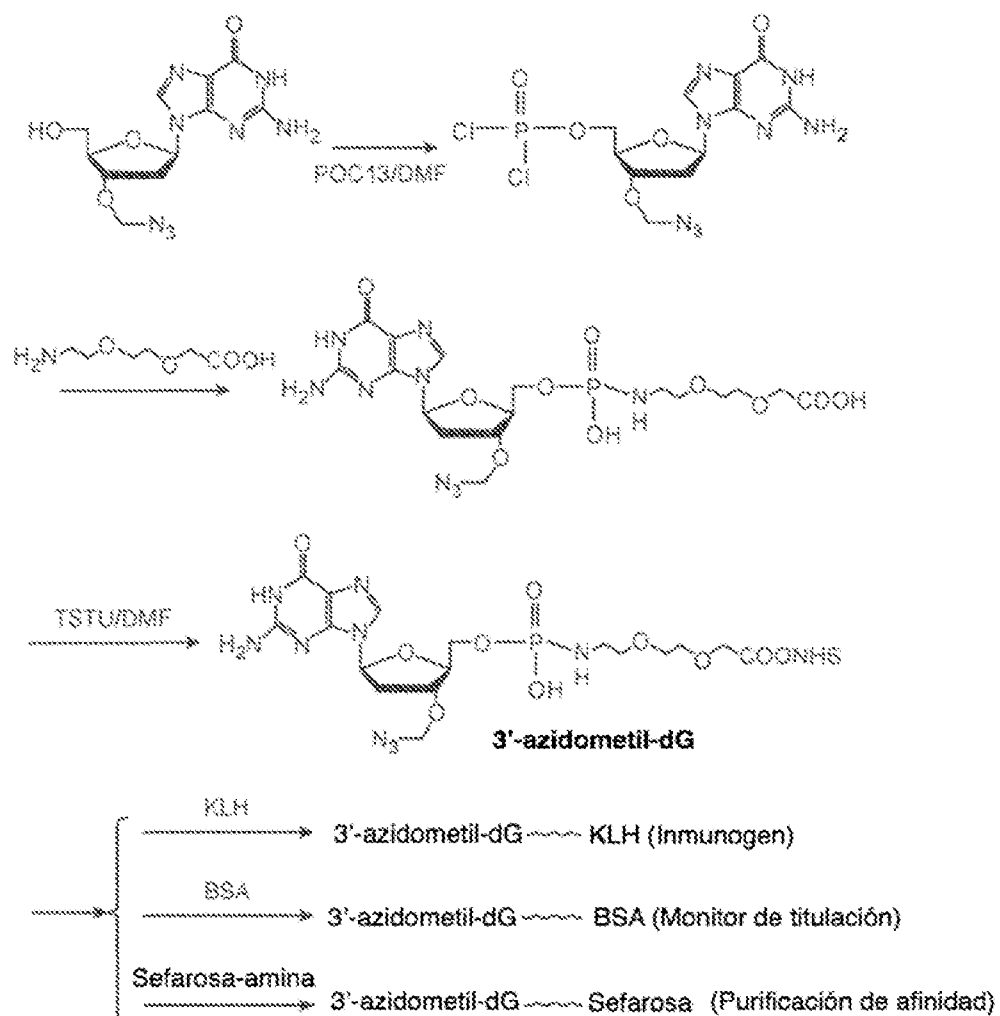
Desarrollo de anticuerpo

FIG. 9

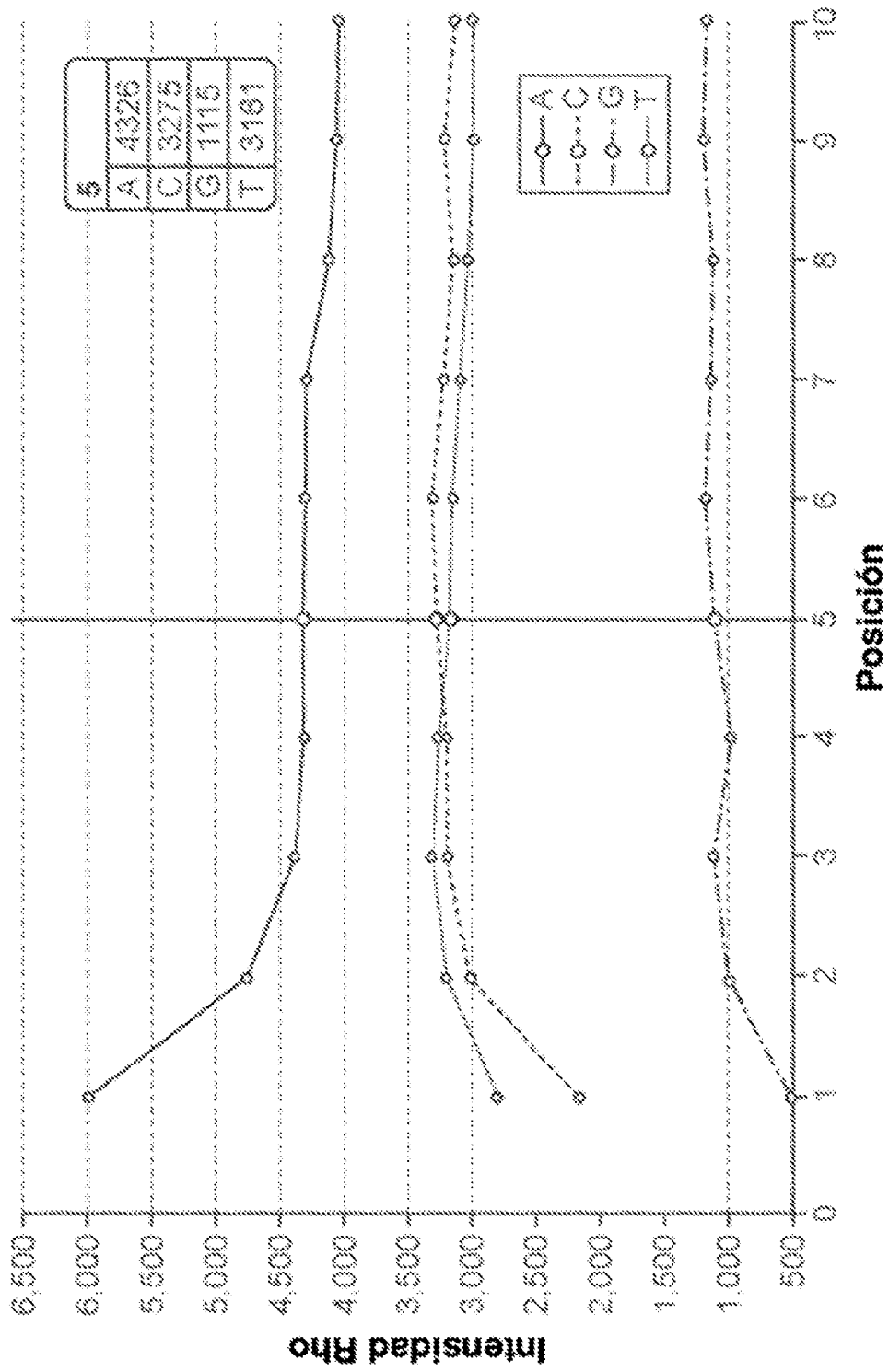


FIG. 10A

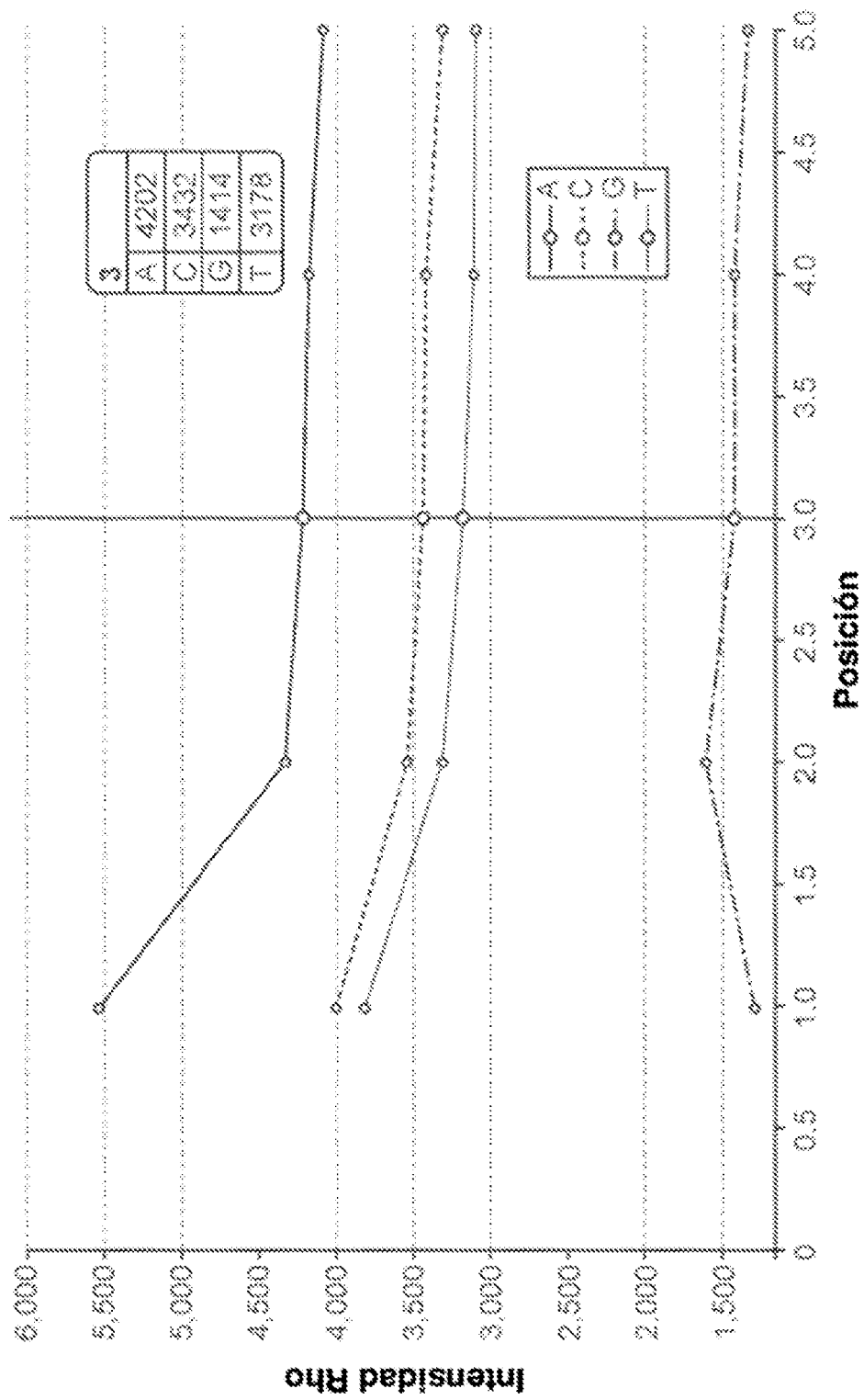


FIG. 10B

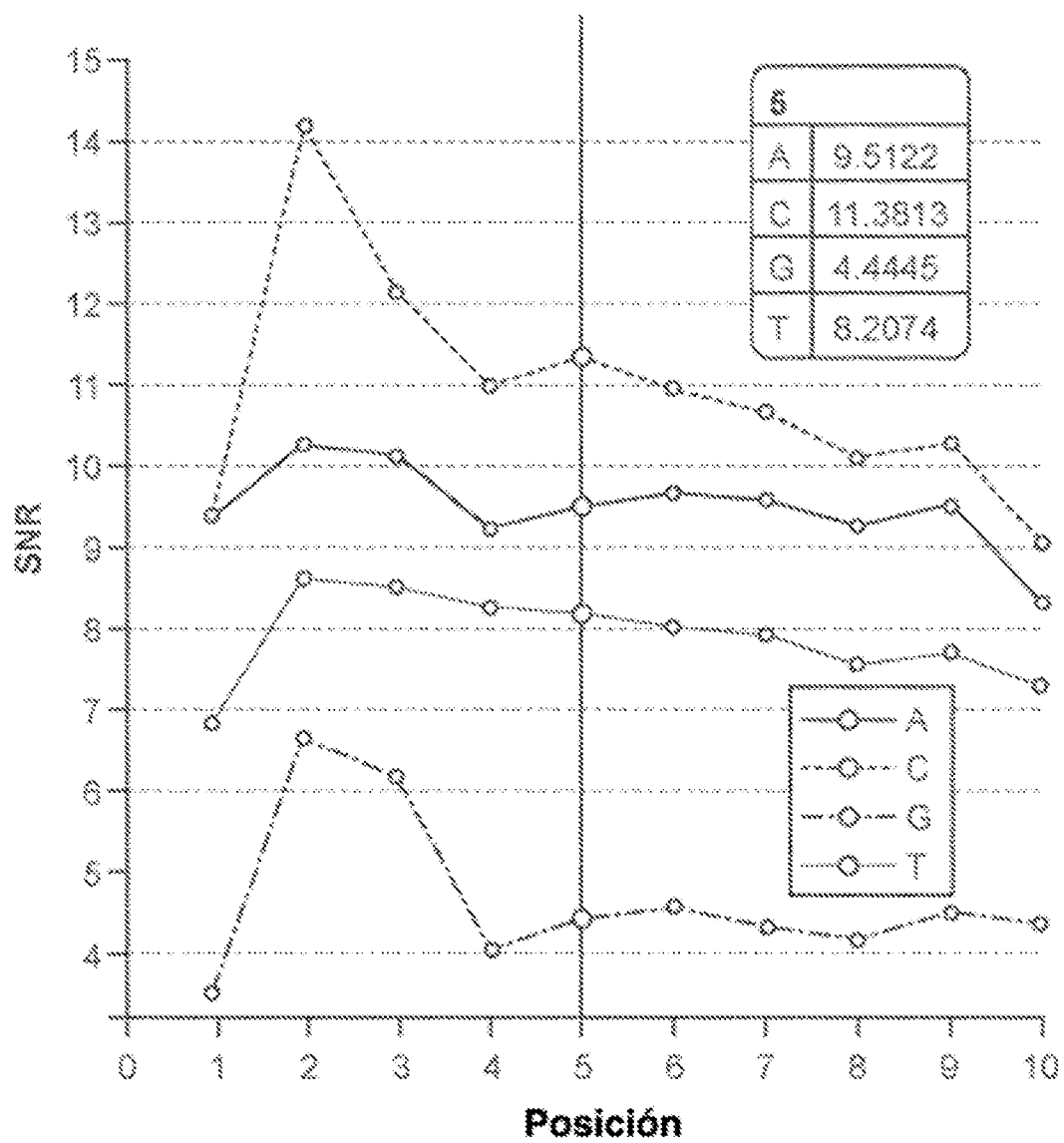


FIG. 10C

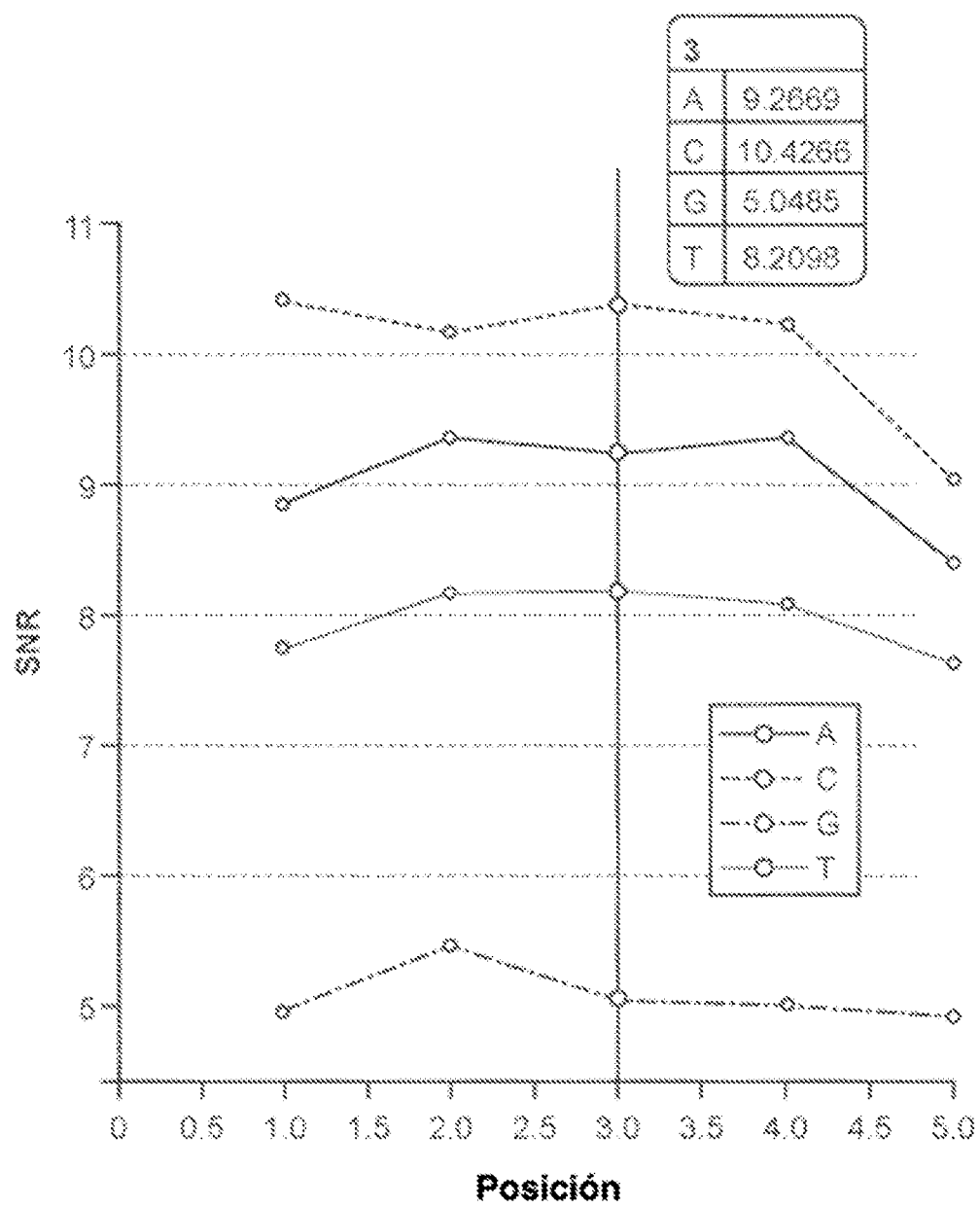


FIG. 10D

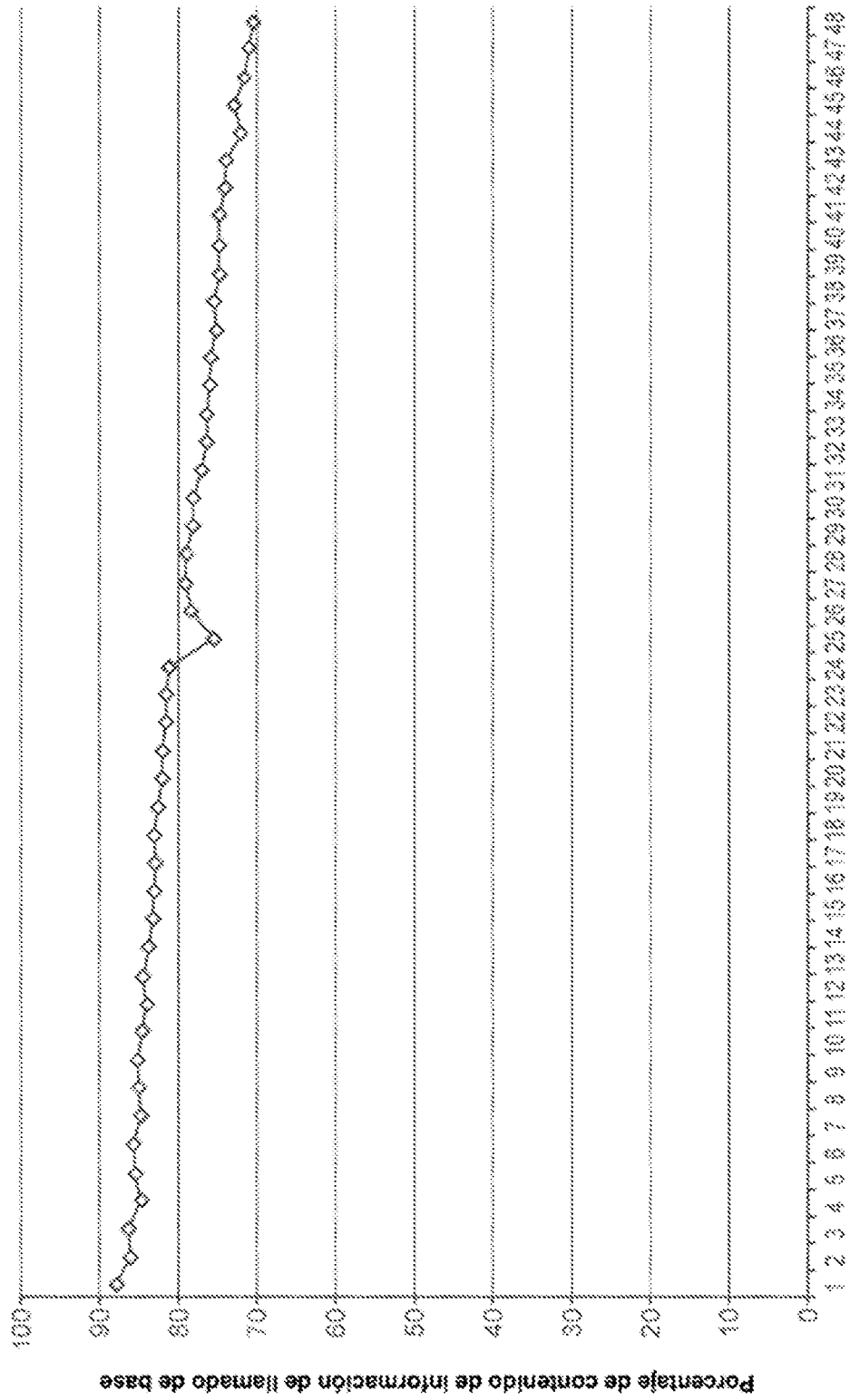


FIG. 11A

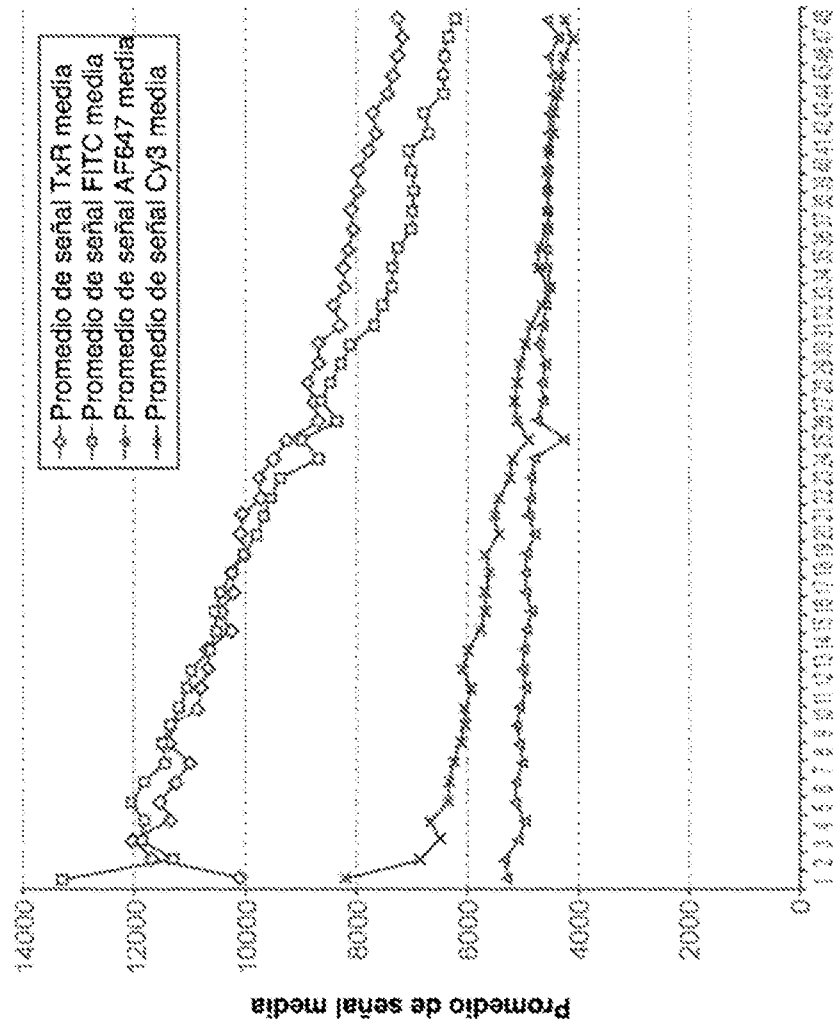


FIG. 11B

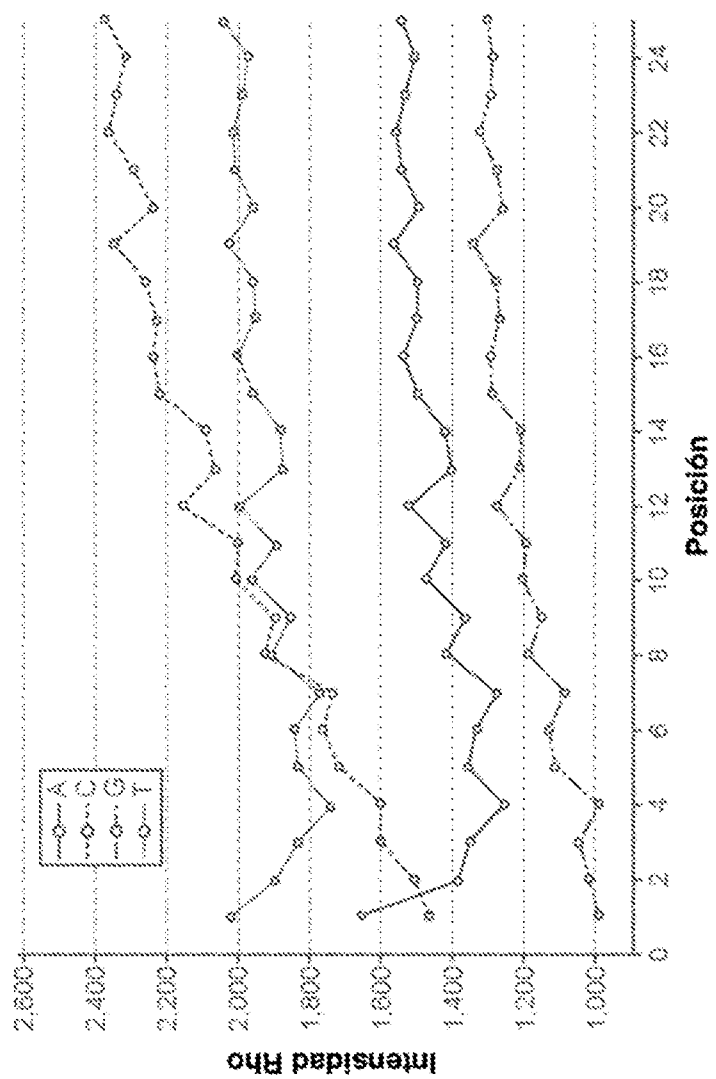


FIG. 12A

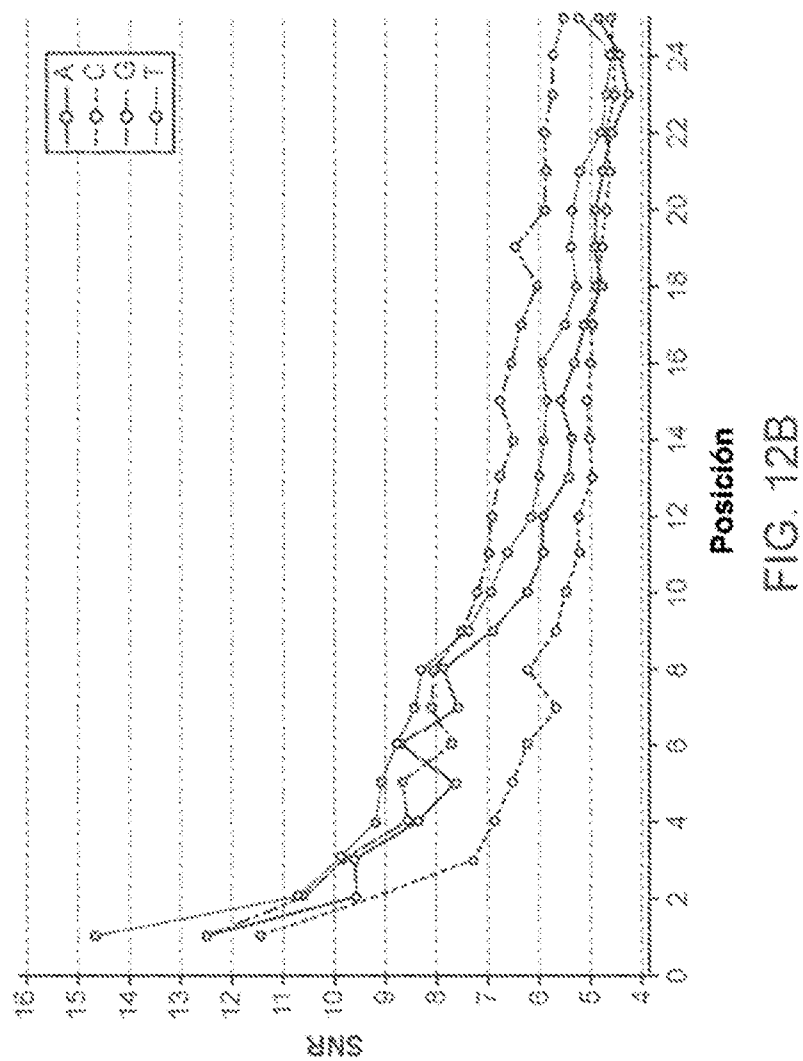


FIG. 12B