



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 329 562**

(51) Int. Cl.:

C09B 11/24 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07D 221/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03025777 .8**

(96) Fecha de presentación : **24.03.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1386946**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

(54) Título: **Procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico que utiliza colorantes de 4,7-dicloro-rodamina.**

(30) Prioridad: **27.03.1999 US 277793**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2009

(73) Titular/es: **Applied Biosystems, L.L.C.**
5791 Van Allen Way
Carlsbad, California 92008, US

(72) Inventor/es: **Lee, Linda G.;**
Benson, Scott C.;
Rosenblum, Barnett B.;
Spurgeon, Sandra L. y
Graham, Ronald J.

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico que utiliza colorantes de 4,7-dicloro-rodamina.

La presente invención se refiere en general a la utilización de los colorantes de 4,7-dicloro-rodamina en los procedimientos para analizar la secuencia de los ácidos nucleicos.

Referencias

- ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer User's Manual, Rev. A, Capítulo 2, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA (p/n 903433) (1995).
- Bergot, J. B., *et al.*, patente US nº 5.366.860 (1994)
- Bergstrom, *et al.*, *JACS*, 111: 374-375 (1989)
- Caskey *et al.*, patente US nº 5.364.759 (1994)
- Connell *et al.*, *Biotechniques*, 5:342-348 (1987)
- Eckstein ed., *Oligonucleotides and Analogs*, capítulos 8 y 9, *IRL Press* (1991)
- Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, *IRL Press* (1991)
- Fung *et al.*, patente US nº 4.757.141 (1988)
- Fung *et al.*, patente US nº 4.855.225 (1989)
- Gait, *Oligonucleotide Synthesis*, *IRL Press* (1990)
- Gebeyehu *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 15:4513-4535 (1987)
- Gibson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 15:6455-6467 (1987)
- Haralambidis *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 15:4856-4876 (1987)
- Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, *Molecular Probes*, Inc. (1992)
- Herrmann, R., Josel, H., Drexhage, K., Arden, J., patente US nº 5.750.409, publicada el 12 de mayo de 1998.
- Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, *Academic Press* (1996)
- Hobbs *et al.*, *J. Org. Chem.*, 54:3420 (1989)
- Hobbs *et al.*, patente US nº 5.151.507 (1992)
- Hunkapiller, *et al.*, patente US nº 4.811.218 (1989)
- Innis *et al.*, eds., *PCR Protocols*, *Academic Press* (1990)
- Ju *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4347-4351 (1995)
- Kasai, *et al.*, *Anal. Chem.*, 47:34037 (1975)
- Khan, S., Menchen, S., Rosenblum, B. "Substituted propargylethoxyamido nucleosides, oligonucleotides and methods for using same", patente US nº 5.770.716, publicado 23 junio, 1998
- Khan, S., Menchen, S., Rosenblum, B. "Propargylethoxyamino nucleotides", patente US nº 5.821.356, publicada el 13 octubre de 1988.
- Khan, S. *et al.*, "Nucleotides including a rigid linker", nº de serie 09,172,789, fecha de presentación 14 de octubre de 1998.
- Khanna, *et al.*, patente US nº 4.318.846 (1988)
- Lee *et al.* *Nucleic Acids Research*, 21:3761-3766 (1993)

ES 2 329 562 T3

Lee, L., Benson, S., Rosenblum, B., Spurgeon, S., Cassel, J. and Graham, R., “4,7-Dichlororhodamine Dyes”, patente US nº 5.847.162, publicado 8 diciembre 1998.

Madabhushi, et al., solicitud de patente internacional WO US94/13852 (1994)

Maniatis, et al., *Methods in Enzymology*, 65:299-305 (1980)

Menchen, et al., patente US nº 5.188.934 (1993)

Mullis, et al., patente US nº 4.683.202 (1987)

Nelson et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 5(3):233-241 (1986)

Nelson, et al., *Nucleic Acids Research* 20(23):6253-6259 (1992a)

Nelson, et al., patente US nº 5.141.813 (1992b)

Nelson, et al., patente US nº 5.401.837 (1995)

Orgel et al., *Nucleic Acids Research* 11 (18):6513 (1983)

Osterman, et al., *Methods of Protein and Nucleic Acid Research*, Vol. 1 Springer-Verlag (1984)

Pringle et al., *DNA Core Facilities Newsletter*, 1:1521 (1988)

Prober et al., *Science*, 238:336-341 (1987)

Rickwood and Hames, eds., *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach*, IRL Press (1981)

Sanger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 74:5463-5467 (1977)

Scheit, et al., *Nucleotide Analogs*, John Wiley (1980)

Smith et al., *Nucleic Acids Research*, 13:2399-2412 (1985)

Smith et al., patente US nº 5.118.800 (1992)

Steiner ed., *Excited States of Biopolymers*, Plenum Press (1983)

Stryer, et al., *Biochemistry* W.H. Freeman (1981)

Vos et al., *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407-4414 (1995)

Vogel, M., Rettig, W., Sens, R., Drexhage, K., *Chemical Physics Letters*, 147:452-60 (1988)

Ward, et al., patente US nº 5.559.767 (1995)

Webber, et al., patente US nº 5.075.217 (1991)

Wheless et al., *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis*, págs. 21-76, Academic Press (1985)

Woo, et al., patente US nº 5.231.191 (1993)

Antecedentes

La detección no radioactiva de analitos biológicos es una tecnología importante en la moderna biotecnología analítica. Al eliminar la necesidad de marcadores radioactivos, se aumenta la seguridad y se reduce en gran medida el impacto medioambiental del vertido de reactivos, dando como resultado menores costes de análisis. Ejemplos de los procedimientos que utilizan dichos procedimientos de detección no radioactivos incluyen el secuenciado del ADN, los procedimientos de sonda de oligonucleótido, la detección de productos de la reacción en cadena de polimerasa, inmunoanálisis y similares.

En muchas aplicaciones se necesita la detección independiente de analitos múltiples que se solapan espacialmente en una mezcla, p. ej., los análisis con sonda de ADN múltiple de un solo tubo, inmunoanálisis, los procedimientos de secuenciado multicolor de ADN y similares. En el caso de los análisis poli-locus con sonda de ADN, al proporcionar detección multicolor, se puede reducir el número de tubos de reacción simplificando de este modo los protocolos experimentales y facilitando la preparación de kits específicos de la aplicación. En el caso del secuenciado de ADN automatizado, el marcado multicolor permite el análisis de las cuatro bases en una sola banda aumentando de este modo

el rendimiento sobre los procedimientos de un solo color y eliminando las incertidumbres asociadas a las variaciones de movilidad electroforética entre bandas.

La detección múltiple impone numerosas limitaciones severas en la selección de los colorantes marcadores, particularmente para análisis que requieren una separación electroforética y para el tratamiento con enzimas, p. ej., el secuenciado de ADN. En primer lugar es difícil hallar un conjunto de colorantes cuyos espectros de emisión se resuelvan espectralmente, ya que la profundidad media de la banda de emisión típica para los colorantes fluorescentes orgánicos es aproximadamente de 40 a 80 nanómetros (nm) y la anchura del espectro disponible está limitada por el foco de luz de excitación. En segundo lugar, incluso si se encuentran colorantes con espectros de emisión no solapantes, el conjunto puede que todavía no sea adecuado si las eficacias fluorescentes respectivas son demasiado bajas. Por ejemplo, en el caso del secuenciado del ADN, el aumento de la cantidad de muestra no puede compensarse por las bajas eficacias de fluorescencia (Pringle). En tercer lugar, cuando se utilizan simultáneamente varios colorantes fluorescentes, la excitación simultánea se hace difícil porque las bandas de absorción de los colorantes se separan ampliamente. En cuarto lugar, la carga, el tamaño molecular y la conformación de los colorantes puede que no afecte desfavorablemente a las movilidades electroforéticas de los fragmentos. Por último, los colorantes fluorescentes pueden ser compatibles con la química utilizada para crear o manipular los fragmentos, p. ej., disolventes y reactivos de síntesis de ADN, tampones, enzimas de polimerasa, enzimas de ligasa y similares.

Debido a estas severas limitaciones, se ha observado que solamente se pueden utilizar unos pocos conjuntos de colorantes fluorescentes en aplicaciones multicolores, particularmente en el área del secuenciado del ADN de cuatro colores (Smith 1992, 1985; Prober; Connell).

Una clase de colorantes fluorescentes particularmente útil en las aplicaciones multicolores son los colorantes de rodamina, p. ej., tetrametil-rodamina (TAMRA), rodamina X (ROX), rodamina 6G (R6G), rodamina 110 (R110) y similares (Bergot). Los colorantes de rodamina son particularmente atractivos en comparación con los colorantes de fluoresceína porque (1) las rodaminas son normalmente más fotoestables que las fluoresceínas, (2) los didesoxinucleótidos marcados con rodamina son mejores sustratos para las enzimas polimerasas termoestables y (3) los espectros de emisión de los colorantes de rodamina son significativamente en el rojo (mayor longitud de onda) de las fluoresceínas.

Sin embargo, un inconveniente importante de los colorantes de rodamina disponibles actualmente en el contexto de los procedimientos de detección múltiples es el espectro relativamente ancho de dichos colorantes. Este espectro de emisión ancho produce resolución espectral entre los colorantes espectralmente próximos dificultando de este modo el análisis de multicomponentes de dichas combinaciones de colorante. Un segundo inconveniente de los colorantes de rodamina disponibles actualmente es que su espectro de absorción no es compatible con la longitud de onda de los láseres de diodo verde de doble frecuencia en estado sólido disponibles actualmente, p. ej. los láseres YAG de neodimio en estado sólido, que tienen una línea de emisión a aproximadamente 532 nm. Presenta muchas ventajas la utilización de dichos láseres debido a su tamaño compacto, vida útil prolongada y utilización eficaz de la potencia.

Sumario

La presente invención se refiere al presente descubrimiento de una clase de colorantes de 4,7-dicloro-rodamina en lo que respecta a la utilización como sondas moleculares.

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico que utiliza una clase de colorantes de rodamina que tenga espectros de emisión que sean sustancialmente más próximos que los colorantes de rodamina disponibles actualmente.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico que utiliza una clase de colorantes de rodamina que tiene un espectro de absorción desplazado hacia el rojo en comparación con los colorantes de rodamina existentes.

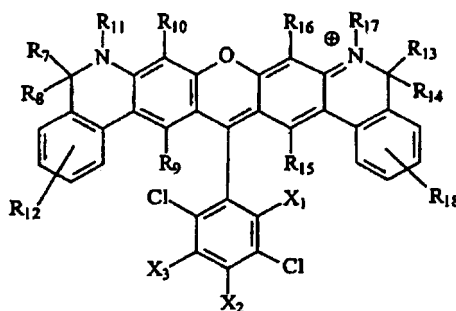
Los objetivos anteriores y otros objetivos de la invención se alcanzan mediante un procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico, que comprende las etapas que consisten en:

(a) formar una mezcla de una primera, una segunda, una tercera y una cuarta clase de polinucleótidos mediante síntesis enzimática dirigida por plantilla que utiliza nucleótidos o cebadores marcados de manera que:

- (i) cada polinucleótido en la primera clase comprende un primer colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la adenosina;
- (ii) cada polinucleótido en la segunda clase comprende un segundo colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la citidina;
- (iii) cada polinucleótido en la tercera clase comprende un tercer colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la guanosina; y

- (iv) cada polinucleótido en la cuarta clase comprende un cuarto colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la timidina o uridina,

en el que el espectro de emisión de los primer, segundo, tercero y cuarto colorantes fluorescentes son resolubles entre sí y en el que además por lo menos uno de los primer, segundo, tercer o cuarto colorantes fluorescentes comprende un compuesto de 4,7-diclororodamina que presenta la fórmula:



en la que:

R_7 - R_{10} , R_{12} - R_{16} , y R_{18} son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, flúor, cloro, metilo, etilo, alquilo C_{1-8} , alqueno C_{2-8} , alquino C_{2-8} , cicloalquilo, fenilo, arilo, sulfonato, sulfona, amino, amido, nitrito, alcoxi C_{1-8} y un enlace y/o R_7 y R_8 y/o R_{13} y R_{14} son considerados conjuntamente y son seleccionados de entre el grupo constituido por oxígeno, azufre, iminio y alquiliminio;

R_{11} y R_{17} son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-8} , sulfonato de alquilo, carboxilato de alquilo, alqueno R_{2-8} , alquino C_{2-8} , cicloalquilo, fenilo, arilo y un enlace; y

X_1 - X_3 son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, cloro, flúor, alquilo C_{1-8} , amina, amida, carboxilato, sulfonato, hidroximetilo, y un enlace,

en la que el compuesto de 4,7-diclororodamina está unido al polinucleótido en una de las posiciones R_7 - R_{18} o X_1 - X_3 ;

(b) separar los polinucleótidos sobre la base de sus tamaños; y

(c) identificar las clases de los polinucleótidos sobre la base de su espectro de fluorescencia.

Las formas de realización del procedimiento de la presente invención son expuestas en las reivindicaciones 2 a 17.

Estos y otros aspectos, objetivos, características y ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto haciendo referencia a la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

A continuación se hará referencia con detalle a las formas de realización preferidas de la invención. Aunque la invención se describirá conjuntamente con las formas de realización preferidas debe entenderse que éstas no pretenden limitar la invención a sus formas de realización. Por el contrario, la invención pretende abarcar las alternativas, modificaciones y equivalentes, que puedan incluirse en la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En general, la presente invención se refiere a la utilización de una nueva clase de compuestos de 4,7-dicloro-rodamina en procedimientos en el área de la biotecnología analítica. Los compuestos utilizados en la presente invención encuentran particular aplicación en el área del secuenciado multicolor fluorescente del ADN y en los análisis de los fragmentos.

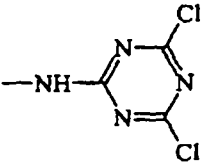
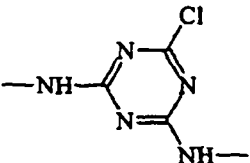
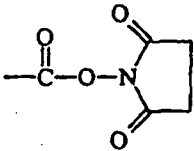
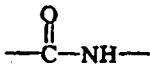
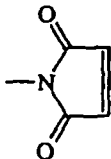
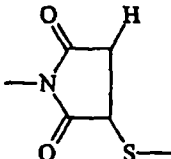
La invención se basa en parte en el descubrimiento de que las propiedades fluorescentes de los colorantes de 4,7-dicloro-rodaminas y relacionados son muy favorables para su utilización como sondas moleculares. Sus anchuras de banda de emisión son generalmente 20 a 30 por ciento más estrechas que las de los análogos que carecen de derivados de 4,7-dicloro, y, sus máximos de emisión y absorción son generalmente a longitudes de onda de aproximadamente 10 a 30 nm mayores que las de los análogos que carecen de los derivados de 4,7-dicloro.

I. Definiciones

A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos y expresiones utilizados en esta memoria están destinados a tener los siguientes significados:

5 “Grupo de unión” (L) se refiere a una funcionalidad capaz de reaccionar con una “funcionalidad complementaria” unida a un reactivo, formando dicha reacción un “enlace” que conecta un colorante con un reactivo. El grupo de unión determinado utilizado depende de la naturaleza de la funcionalidad complementaria y del tipo de enlace deseado. En algunos casos, el grupo de unión se puede activar antes de la reacción con una funcionalidad complementaria, p. ej., la activación de un grupo de unión carboxilato con diciclohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida para formar un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Preferentemente, siempre que la funcionalidad complementaria es una amina, el grupo de unión de la invención es isotiocianato, isocianato, acil azida, éster de NHS, cloruro de sulfonilo, aldehído o glioxal, epóxido, carbonato, haluro de arilo, imidoéster, carbodiimida, anhídrido, 4,6-diclorotriazinilamina u otros carboxilatos activos. Preferentemente, siempre que la funcionalidad complementaria es sulfhidrilo, el grupo de unión es haloacetilo, haluro de alquilo, maleimida, aziridina, acrilóilo o agente de arilación, p. ej., fluorobenceno y similares. Cuando la funcionalidad complementaria es carboxilato, el grupo de unión es preferentemente diazoalano, diazoacetilo, carbonildiimidazol y carbodiimida (Hermanson). En una forma de realización particularmente preferida, el grupo de unión es un éster de NHS activado que reacciona con una funcionalidad complementaria de amina, en la que al formar el éster de NHS activado, un colorante utilizado en la presente invención incluyendo un grupo de unión de carboxilato se hace reaccionar con diciclohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Khanna; Kasai). La Tabla 1 siguiente presenta un muestreo de grupos de unión representativos junto con funcionalidades complementarias compatibles y los enlaces resultantes.

TABLA 1

Grupo de unión	Funcionalidad complementaria	Enlace
—NCS	—NH ₂	—NHCSNH—
	—NH ₂	
—SO ₂ H	—NH ₂	—SO ₂ NH—
	—NH ₂	
—NH—C(=O)—CH ₂ I	—SH	—NH—C(=O)—CH ₂ S—
	—SH	

El término “alquil inferior” indica hidrocarburos de cadena lineal y ramificada que contienen de 1 a 8 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, isopropilo, tert-butilo, isobutilo, sec-butilo, neopentilo, tert-pentilo y similares.

El término “propano” en particular se refiere al grupo —CH₂CH₂CH₂—.

“Cicloalquilo” se refiere a grupos de hidrocarburo que forman anillos, p. ej. ciclohexilo y ciclopentilo. Los átomos de nitrógeno con sustituyentes cicloalquilo pueden formar aziridinilo, azetidínilo, pirrolidinilo, piperidinilo, anillos mayores y formas sustituidas de los mismos.

5 “Alquilo inferior sustituido” indica un alquilo inferior que incluye sustituyentes que ceden electrones, tales como halo, ciano, nitro, sulfo y similares.

10 “Haloalquilo inferior” indica un alquilo inferior sustituido con uno o más sustituyentes con átomo de halógeno, normalmente flúor, cloro, bromo o yodo.

“Alqueno inferior” indica un alquilo inferior o un alquilo inferior sustituido en el que uno o más de los enlaces carbono-carbono es un doble enlace.

15 “Alquino inferior” indica un alquilo inferior o un alquilo inferior sustituido en el que uno o más de los enlaces carbono-carbono es un triple enlace.

“Alcoxi inferior” se refiere a un grupo que incluye un alquilo inferior unido por un enlace sencillo a un átomo de oxígeno.

20 “Ariilo” se refiere a un fenil sencillo o múltiple o fenil sustituido, p. ej., benceno, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

El término “nucleósido” se refiere a un compuesto constituido por una base de nucleósido de purina, azapurina o pirimidina, p. ej., adenina, guanina, citosina, uracilo, timina, deazaadenina, deazaguanosina y similares, unida a una pentosa en la posición 1', incluyendo las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo (Stryer). El término “nucleótido” utilizado en esta memoria se refiere a un éster de fosfato de un nucleósido, p. ej. ésteres de trifosfato, en el que el punto más común de esterificación es el grupo hidroxilo unido a la posición C-5 de la pentosa. Muchas veces en la presente descripción el término nucleósido estará destinado a incluir tanto nucleósidos como nucleótidos.

30 “Análogos” en referencia a los nucleósidos incluyen los análogos sintéticos que tienen grupos de la base modificados, grupos del azúcar modificados y/o grupos del éster de fosfato modificados, p. ej., como se describe en otras partes (Scheit; Eckstein). El término “nucleósido marcado” se refiere a los nucleósidos que están unidos por enlaces covalentes a los compuestos de colorante de la Fórmula I.

35 Tal como se utilizan en esta memoria, los términos “polinucleótido” o “oligonucleótido” se refieren a polímeros lineales de monómeros de nucleótido naturales o a sus análogos, incluyendo los desoxirribonucleótidos de una sola cadena, los ribonucleótidos, las formas α -anómicas de los mismos y similares. Normalmente, los monómeros de nucleósido están unidos por enlaces fosfodiéster, en los que tal como se utiliza en esta memoria, el término “enlace fosfodiéster” se refiere a los enlaces fosfodiéster o a los análogos de los mismos que incluyen fosforotioato, 40 fosforoditionato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotionato, fosforanilidato, fosforamidato y similares, incluyendo los contraiones asociados, p. ej., H^+ , NH_4^+ , Na^+ y similares si dichos contraiones están presentes. Los polinucleótidos oscilan normalmente de tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, p. ej. de 8 a 40, hasta varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido está representado por una secuencia de letras, tal como “ATGCCTG”, se entiende que los nucleótidos están en el orden 5'→3' de izquierda a derecha y que “A” indica desoxiadenosina, “C” indica desoxicitidina, “G” indica desoxiguanosina y “T” indica desoxitimidina, a menos que se indique de otra manera.

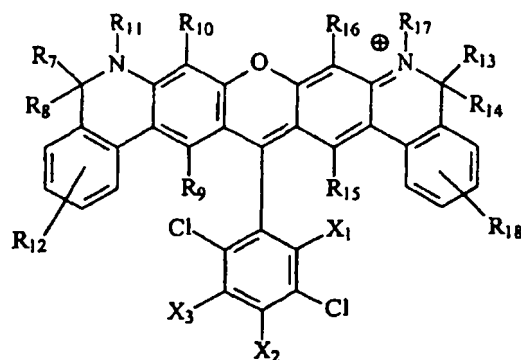
50 Tal como se utiliza en esta memoria, el término “resolución espectral” referido a un conjunto de colorantes significa que los espectros de emisión fluorescente de los colorantes son suficientemente distintos, es decir, suficientemente no solapantes, de los reactivos a los cuales están unidos los colorantes respectivos, p. ej., polinucleótidos, se pueden distinguir basándose en la señal fluorescente generada por los respectivos colorantes utilizando sistemas de fotodetección normales, p. ej., empleando un sistema de filtros de paso de banda y tubos multiplicadores, un dispositivo acoplado con carga juntamente con un espectrógrafo, o similares, tal como se ejemplifica con los sistemas descritos en otras partes (Hunkapiller; Wheelless).

55 El término “sustituido” tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una molécula en la que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con uno o más átomos distintos del hidrógeno, grupos funcionales o grupos. Por ejemplo, un nitrógeno no sustituido es $-NH_2$, mientras que un nitrógeno sustituido es $-NHCH_3$. Ejemplos de sustituyentes incluyen pero no se limitan a halo, p. ej., flúor y cloro, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior, sulfato, 60 sulfonato, sulfonato, amino, amonio, amido, nitrilo, alcoxi inferior, fenoxi, aromáticos, fenilo, aromáticos policíclicos, heterociclos y grupos de unión.

II. Compuestos colorantes de 4,7-dicloro-rodamina

65 La nueva clase de compuestos colorantes de 4,7-dicloro-rodamina utilizada en la presente invención presenta la estructura general mostrada a continuación como Fórmula I. (Obsérvese que todas las estructuras moleculares proporcionadas en toda la exposición están destinadas a abarcar no sólo la estructura electrónica exacta, sino tam-

bién a incluir todas las estructuras resonantes, enantiómeros, diastereoisómeros y los estados de protonación de los mismos).



FÓRMULA I

En la Fórmula I, R_7 - R_{10} , R_{12} - R_{16} y R_{18} pueden ser hidrógeno, flúor, cloro, metilo, etilo, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior, cicloalquilo, fenilo, arilo, sulfonato, sulfona, amino, amido, nitrilo, alcoxi inferior, grupo de unión o combinaciones de los mismos. Preferentemente, R_7 - R_{10} y R_{13} - R_{16} son hidrógeno, metilo o etilo. R_7 y R_8 y/o R_{13} y R_{14} , considerados conjuntamente pueden ser oxígeno (=O), azufre (=S), iminio (=NH), alquiliminio (=NR). R_{11} y R_{17} pueden ser hidrógeno, alquilo inferior, sulfonato de alquilo, carboxilato de alquilo, alqueno inferior, alquino inferior, cicloalquilo, fenilo, arilo, grupo de unión o sus combinaciones. Preferentemente R_{11} y R_{17} son metilo o fenilo. X_1 - X_3 considerados independientemente son hidrógeno, cloro, flúor, alquilo inferior, amina, amida, carboxilato, ácido sulfónico (sulfonato), hidroximetilo ($-\text{CH}_2\text{OH}$), y grupos de unión. Preferentemente, X_1 es carboxilato y X_2 y X_3 considerados independientemente son hidrógeno o un grupo de unión. Determinadas formas de realización preferidas son cuando R_7 , R_8 , R_{10} , R_{13} , R_{14} y R_{16} son hidrógeno o metilo, R_9 y R_{15} son hidrógeno, R_{11} y R_{17} son metilo o fenilo y R_{12} y R_{18} son hidrógeno.

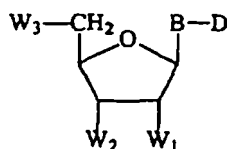
III. Reactivos que utilizan compuestos colorantes de 4,7-dicloro-rodamina

La presente invención utiliza los reactivos marcados con los compuestos colorantes de 4,7-dicloro-rodamina de Fórmula I. Los reactivos utilizados en la invención pueden ser nucleótidos, nucleósidos o polinucleótidos. Los colorantes se unen por enlace covalente al reactivo directamente o mediante un enlace.

A. Reactivos de nucleótidos

Una clase preferida de reactivos utilizada en la presente invención comprende nucleótidos y nucleósidos que incorporan los colorantes de Fórmula I. Dichos reactivos del lado del nucleótido son particularmente útiles en el contexto de los polinucleótidos de marcado formados por la síntesis enzimática, p. ej., los trifosfatos de nucleótido utilizados en el contexto de la amplificación por PCR, el secuenciado del polinucleótido de tipo Sanger y las reacciones de traducción en la hendidura.

Los reactivos de la parte del nucleótido preferidos utilizados en la presente invención se presentan a continuación en la Fórmula II



FÓRMULA II

en la que

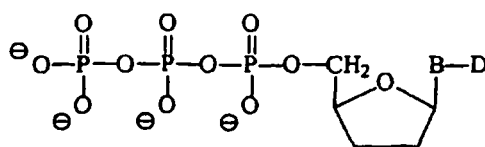
B es una base de nucleótido; una base de nucleótido de 7-deazapurina, purina o pirimidina, análogos de las mismas y preferentemente uracilo, citosina, deazaadenina o deazaguanosina; D es el compuesto de colorante de 4,7-dicloro-

ES 2 329 562 T3

rodamina de Fórmula I; W_1 y W_2 considerados por separado son H u OH. W_3 es OH, OPO_3 , OP_2O_6 , OP_3O_9 , incluyendo los análogos de los mismos, p. ej., fosfortioato, fosforoanilato, fosforoanilotioato, fosforoamidiato y otros como análogos de fosfato, incluyendo los contraaniones asociados si están presentes, p. ej., H^+ , Na^+ , NH_4^+ y similares. En una forma de realización preferida, W_1 es H, W_2 es OH y W_3 es OP_3O_9 . En una segunda forma de realización preferida, W_1 y W_2 son H y W_3 es OP_3O_9 . Cuando B es purina o 7-deazapurina, el grupo azúcar está unido en la posición N^9 de la purina o deazapurina y cuando B es pirimidina, el grupo azúcar está unido en la posición N^1 de la pirimidina. El enlace que une B y D está conectado a Den una de las posiciones R_7 - R_{18} o X_1 - X_3 .

Preferentemente, el enlace está conectado a uno de X_2 o X_3 . Preferentemente, cuando B es una purina, el enlace que une B y D está conectado en la posición 8 de la purina, cuando B es 7-deazapurina, el enlace está conectado a la posición 7 de la 7-deazapurina y cuando B es pirimidina, el enlace está conectado a la posición 5 de la pirimidina.

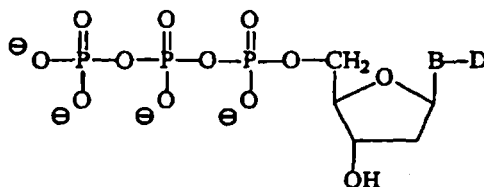
En una forma de realización particularmente preferida, los nucleótidos utilizados en la presente invención son trifosfatos de didesoxinucleótido que tienen la estructura mostrada a continuación en la Fórmula III, incluyendo los contraiones asociados si están presentes.



FORMULA III

Los didesoxinucleótidos marcados tal como los mostrados en la Fórmula III encuentran particular aplicación como agentes de terminación, o "terminadores", en los procedimientos de secuenciado del ADN de tipo Sanger (Sanger).

En una segunda forma de realización particularmente preferida, los nucleótidos utilizados en la presente invención son trifosfatos de desoxinucleótido que tienen la estructura mostrada en la Fórmula IV a continuación, incluyendo los contraiones asociados si están presentes.



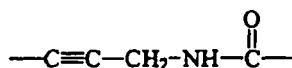
FÓRMULA IV

Los desoxinucleótidos marcados tal como los mostrados en la Fórmula IV hallan particular aplicación como medio para marcar los productos de ampliación de la polimerasa, p. ej., en la reacción en cadena de polimerasa (Mullis).

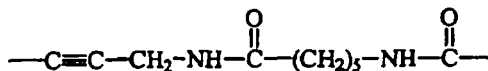
El marcado de la parte del nucleótido se puede realizar utilizando cualquiera de las numerosas técnicas de marcado de la tendencia del nucleósido utilizando grupos de unión conocidos, y funcionalidades complementarias asociadas para formar enlaces. Véase lo anterior para una exposición de los grupos de unión preferidos. El enlace que une el colorante y el nucleósido debería (i) no interferir con la hibridación oligonucleótido-diana, (ii) ser compatible con enzimas apropiadas, p. ej., polimerasas, ligasas y similares y (iii) no extinguir la fluorescencia del colorante.

En una forma de realización preferida, los colorantes de Fórmula I se unen por enlace covalente al carbono 5 de las bases de pirimidina o al carbono 7 de las bases de 7-deazapurina. Se han descrito varios procedimientos de marcado de bases adecuados que se pueden utilizar en la invención. (Gibson; Gebeyehu; Haralambidis; Nelson 1992a; Nelson 1992b; Bergstrom; Fung 1988; Ward; Woo).

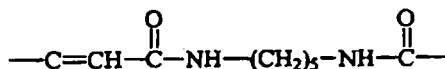
Preferentemente, los enlaces son enlaces amidoacetilénicos o amidoalquénicos, formándose el enlace entre el colorante y la base de nucleótido al reaccionar un éster de NHS activado del colorante con una base de un nucleótido derivada de alquililamino o de alquililamino. Más preferentemente, el enlace resultante es 3-(carboxi)amino-1-propinilo o 3-amino-1-propin-1-ilo (Fórmula V.1). A continuación se presentan varios enlaces preferidos para unir los colorantes de Fórmula I a una base de nucleósido como Fórmulas V.1-6 (Khan).



FÓRMULA V.1



FÓRMULA V.2



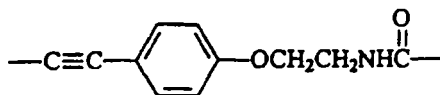
FÓRMULA V.3



FÓRMULA V.4



FÓRMULA V.5



FÓRMULA V.6

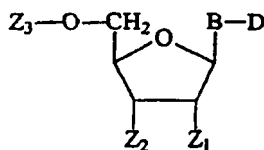
La síntesis de los nucleósidos derivados de alquinilamino está descrita por Hobbs 1989, 1992. En resumen, los nucleótidos derivados de alquinilamino se forman colocando el halodidesoxinucleósido apropiado (normalmente di-

desoxinucleósidos de 5-yodopirimidina y de 7-yodo-7-deazapurina) y Cu(I) en un matraz, arrastrando con argón para eliminar el aire, añadiendo DMF anhidra, seguido de adición de una alquinilamina, trietilamina y Pd⁰. La mezcla de reacción se agita durante varias horas, o hasta que la cromatografía en capa fina indique el consumo de halodidesoxinucleósido. Cuando se utiliza una alquilamina no protegida, se puede aislar el nucleósido de alquinilamino concentrando la mezcla de reacción y cromatografiando en gel de sílice utilizando un disolvente de elución que contiene hidróxido de amonio para neutralizar el hidrohaluro generado en la reacción de acoplamiento. Cuando se utiliza una alquilamina protegida, se puede añadir metanol/cloruro de metileno a la mezcla de reacción, seguido de la forma bicarbonato de una resina de intercambio iónico fuertemente básica. A continuación se puede agitar la suspensión durante aproximadamente 45 minutos, se filtra y se enjuaga la resina con cloruro de metanol/metileno adicional. Los filtrados combinados se pueden concentrar y purificar por cromatografía de flash en gel de sílice utilizando un gradiente de cloruro de metanol/metileno. Los 5'-trifosfatos se obtienen por técnicas normales.

B. Reactivos de polinucleótido

Otra clase preferida todavía de reactivos utilizada en la presente invención comprende polinucleótidos marcados con los colorantes de 4,7-dicloro-rodamina de Fórmula I. Dichos polinucleótidos marcados son útiles en numerosos contextos importantes que incluyen como cebadores de secuenciado de ADN, cebadores de PCR, sondas de hibridación de oligonucleótido y similares.

Los polinucleótidos utilizados en la invención incluyen un nucleótido que tiene la fórmula:



FÓRMULA VI

en la que los sustituyentes variables y enlaces se definen de la forma siguiente. D es un compuesto colorante de 4,7-dicloro-rodamina de Fórmula I. B es una base de nucleótido de 7-deazapurina, purina o pirimidina, preferentemente de uracilo, citosina, deazaadenina o deazaguanosina. Z₁ es H, OH u OCH₃. Z₂ es H, OH, OPO₃, OP₂O₆, OP₃O₉, o Nuc, nucleótido próximo, en el que Nuc y el nucleósido están unidos por un enlace fosfodiéster o un análogo del mismo, p. ej., fosforotioato, fosforoanilidato, fosforoanilitioato, fosforoamidiato y otros análogos de fosfato similares, incluyendo los contraiones asociados si están presentes, p. ej. H⁺, Na⁺, NH₄⁺, estando unido el enlace en la posición 5' de Nuc. Z₃ es H, OPO₂, incluyendo los análogos de fosfato, o Nuc, en el que Nuc y el nucleósido están unidos por un enlace fosfodiéster o un análogo del mismo, estando conectado el enlace a la posición 3' de Nuc, en el que Nuc se refiere a un nucleósido, nucleótido o polinucleótido. Cuando B es purina o 7-deazapurina, el grupo azúcar está unido a la posición N⁹ de la purina o deazapurina y cuando B es pirimidina, el grupo azúcar está unido a la posición N¹ de la pirimidina. B está conectado al grupo azúcar y al compuesto colorante como se describió anteriormente para el reactivo nucleótido utilizado en la invención. Como se definió, el nucleótido marcado de Fórmula VI puede ser el nucleótido con terminal 5', el nucleótido con terminal 3' o cualquier nucleótido interno del polinucleótido.

En una forma de realización preferida, el polinucleótido utilizado en la presente invención incluye colorantes múltiples, uno de los cuales al menos es un compuesto colorante de Fórmula I, situado de modo que la transferencia de energía de fluorescencia tenga lugar entre un colorante donante y un colorante aceptor. Dichos polinucleótidos multi-colorantes encuentran aplicación como sondas espectralmente sintonizables o como cebadores de secuenciado de ADN (Ju; Lee 1993; Lee 1999).

Los polinucleótidos marcados se pueden sintetizar bien por vía enzimática, p. ej., utilizando una DNA- polimerasa o ligasa (Stryer) o por síntesis química, p. ej., por el método de la fosforamidita, el método del fosfito-triéster y similares (Gait). Los marcadores se pueden introducir durante la síntesis enzimática utilizando monómeros marcados de trifosfato de nucleótido como se describió anteriormente o se pueden introducir después de la síntesis.

En general, si el polinucleótido marcado se prepara por síntesis enzimática, se puede utilizar el siguiente procedimiento. Se desnaturaliza una plantilla de ADN y se hibrida un cebador de oligonucleótido a la plantilla de ADN. Se añade una mezcla de trifosfatos de desoxinucleótido y/o de trifosfatos de didesoxinucleótido a la reacción incluyendo dGTP, dATP, dCTP, ddTTP, ddCTP, ddATP, ddCTP y ddTTP, en los que al menos una fracción de uno de por lo menos uno de los desoxinucleótidos y/o didesoxinucleótidos está marcado con un compuesto colorante de Fórmula I tal como se describió anteriormente. A continuación, se añade una enzima polimerasa en condiciones en las que su actividad de polimerasa esté operativa. Durante la síntesis de la cadena de polimerasa se forma un polinucleótido marcado por la incorporación de los desoxinucleótidos y/o didesoxinucleótidos marcados. En un procedimiento de síntesis enzimático alternativo, se utilizan dos cebadores en lugar de uno, un cebador complementario de la cadena + (más) y el otro complementario de la cadena - (menos) de la diana, la polimerasa es una polimerasa termoestable y la temperatura de reacción se cicla entre una temperatura de desnaturalización y una temperatura de extensión, sintetizando exponencialmente de este modo un complemento marcado para la secuencia objetivo por PCR (Mullis; Innis).

Después de la síntesis, se puede marcar el polinucleótido en numerosas posiciones incluyendo el terminal 5' (Eckstein; Orgel; Smith 1985; Smith 1992); el eje central del fosfodiéster (Eckstein); o el terminal en 3' (Nelson 1992a; Nelson 1992b; Nelson 1995). Para un estudio completo de los procedimientos de marcado de oligonucleótidos véase (Steiner).

En un procedimiento preferido de marcado químico después de la síntesis, se marca un oligonucleótido de la forma siguiente. Se transforma un colorante que incluye un grupo de unión carboxilato en el éster de NHS haciéndolo reaccionar con aproximadamente 1 equivalente de 1,3-diciclohexilcarbodiimida y aproximadamente 3 equivalentes de N-hidroxisuccinimida en acetato de etilo anhidro durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lava la mezcla de reacción con HCl al 5%, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra hasta un sólido que se vuelve a poner en suspensión en DMSO. Se añade a continuación la solución madre de colorante en DMSO en exceso (10-20 x) a un oligonucleótido derivado de aminohexilo en tampón de bicarbonato-carbonato 0,25 M a pH 9,4 y se deja reaccionar durante 6 horas (Fung 1988). Se separa el oligonucleótido marcado con colorante del colorante sin reaccionar pasándolo a través de una columna de cromatografía por exclusión de tamaño eluyendo con tampón, p. ej., acetato de trietilamonio 0,1 molar (TEAA). La fracción que contiene el oligonucleótido marcado en bruto se purifica después por HPLC en fase inversa empleando gradiente de elución.

IV. Procedimientos que utilizan los compuestos y reactivos de la invención

Los colorantes y reactivos utilizados en la presente invención son muy aconsejables para los procedimientos que utilizan la detección fluorescente, en particular para los procedimientos que requieren la detección simultánea de analitos múltiples solapantes. Los colorantes y reactivos descritos en la invención son muy aconsejables en particular para identificar clases de polinucleótidos que se han sometido a un procedimiento de separación bioquímica, tal como la electroforesis, en el que una serie de bandas o manchas de sustancias objetivo que tienen propiedades fisicoquímicas similares, p. ej., el tamaño, la conformación, la carga, la hidrofobia o similares, están presentes en una disposición lineal o plana. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "bandas" incluye cualquier agrupamiento o acumulación espacial de analitos sobre la base de propiedades fisicoquímicas similares idénticas. Normalmente las bandas aumentan en la separación de los conjugados colorante-polinucleótido por electroforesis.

Las clases de polinucleótidos pueden aumentar en varios contextos. En una categoría preferida de procedimientos denominados en esta memoria procedimientos de "análisis de fragmentos" o de "análisis genéticos", se generan fragmentos de polinucleótido marcados mediante la síntesis enzimática dirigida a la plantilla utilizando cebadores o nucleótidos marcados, p. ej., por ligadura o extensión del cebador dirigida por la polimerasa; los fragmentos se someten a un proceso de separación en función del tamaño, p. ej., electroforesis o cromatografía; y, los fragmentos separados se detectan después de la separación, p. ej., por fluorescencia producida por láser. En una forma de realización particularmente preferida, se separan simultáneamente múltiples clases de polinucleótidos y las diferentes clases se distinguen por etiquetas resolubles por vía espectral.

Dicho método de análisis de fragmentos conocido como detección del polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado (AmpFLP) se basa en polimorfismos de longitud del fragmento amplificado, es decir, polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción que están amplificados por PCR (Vos). Estos fragmentos amplificados de tamaño variable sirven como marcadores conectados para los siguientes genes mutantes en todas las familias. Cuanto más próximo está el fragmento amplificado al gen mutante en el cromosoma, mayor es la correlación con el enlace. Debido a que no se han identificado los genes de muchos trastornos genéticos, estos marcadores de enlace sirven para ayudar a evaluar el riesgo de enfermedad o la paternidad. En la técnica de AmpFLP, los polinucleótidos pueden estar marcados utilizando un cebador por PCR de polinucleótido marcado o utilizando trifosfatos de nucleótido marcados en la PCR.

Otro ejemplo de procedimiento de análisis del fragmento se basa en el número variable repeticiones en serie o VNTR (Webber; Caskey). Las VNTR son zonas de ADN de doble cadena que contienen copias múltiples adyacentes de una secuencia determinada, siendo variable el número de unidades repetidas. Ejemplos de locus de VNTR son pYNZ22, pMCT118 y Apo B. Un subconjunto de procedimientos VNTR son aquellos procedimientos basados en la detección de repeticiones microsatélite o repeticiones cortas en serie (STR), es decir, repeticiones de ADN en serie caracterizadas por una secuencia corta (2 a 4 bases) repetida. Una de las familias más abundante de ADN entremezclado repetido en el hombre es la familia de dinucleótido repetido (dC-dA)_n-(dG-dT)_n (denominada también familia (CA)_n de dinucleótido repetido). Se cree que existen tantas como 50.000 a 100.000 (CA)_n zonas repetidas en el genoma humano, normalmente con 15 a 30 repeticiones por bloque. Muchas de estas zonas repetidas son polimórficas en longitud y pueden servir, por lo tanto, como marcadores genéticos útiles. Preferentemente, en los procedimientos VNTR o STR, se introduce un colorante marcador en los fragmentos de polinucleótido utilizando un cebador de PCR marcado con colorante.

En un método de análisis del fragmento particularmente preferido, las clases identificadas según la invención se definen desde el punto de vista de los nucleótidos terminales de modo que se establece una correspondencia entre las cuatro bases terminales posibles y los elementos de un conjunto de colorantes que se pueden resolver espectralmente (Fung 1989). Dichos conjuntos se montan fácilmente a partir de los colorantes de Fórmula I midiendo la emisión y la anchura de la banda de absorción con espectrofotómetros disponibles en el comercio. Más preferentemente, las clases aumentan en el contexto de la química o de los procedimientos de terminación de la cadena del secuenciado de ADN, y más preferentemente las clases aumentan en el contexto del procedimiento de terminación de la cadena, es decir, secuenciado de didesoxi ADN, o secuenciado de Sanger. Este procedimiento implica la síntesis de una cadena de ADN por una ADN polimerasa *in vitro* utilizando una plantilla de ADN de una sola cadena o de dos cadenas cuya secuencia se ha de determinar. La síntesis se inicia en el único sitio en el que un cebador del oligonucleótido se hibrida con la plantilla. La reacción de síntesis se termina por la incorporación de un análogo de nucleótido que no soportará la elongación continuada de ADN. Los análogos del nucleótido de terminación de la cadena son normalmente 5'-trifosfatos de 2',3'-didesoxinucleósido (ddNTP) que carecen del grupo 3'-OH necesario para la elongación de la cadena de ADN de 3' a 5'. Cuando se utilizan proporciones adecuadas de dNTP (5'-trifosfatos de 2'-desoxinucleósido) y uno de los cuatro ddNTP, la polimerización catalizada por el enzima se terminará en una fracción de la población de cadenas en cada sitio en el que el ddNTP se puede incorporar. Si se utilizan cebadores marcados o ddNTP marcados para cada reacción, se puede detectar por fluorescencia la información de la secuencia después de la separación por electroforesis de alta resolución. En el procedimiento de terminación de la cadena, los colorantes de Fórmula I pueden estar unidos a los cebadores de secuenciado o a los didesoxinucleótidos.

En cada uno de los procedimientos de análisis del fragmento anteriores los polinucleótidos marcados se separan preferentemente por procedimientos electroforéticos (Rickwood y Harnes: Osterman). Preferentemente el tipo de matriz electroforética es poliácridamida reticulada o sin reticular con una concentración (peso a volumen) de entre aproximadamente 2 a 20 por ciento en peso. Más preferentemente, la concentración de poliácridamida está comprendi-

da entre aproximadamente 4 y 8 por ciento. Preferentemente en el contexto del secuenciado de ADN en particular, la matriz de la electroforesis incluye una cadena que separa o desnaturaliza el agente, p. ej., urea, formamida y similares. Los procedimientos detallados para construir dichas matrices están dados por Maniatis 1980; y *ABI PRISM™ 377 ADN Sequencer User's Manual*. La concentración de polímero, pH, temperatura, concentración de agente desnaturante, etc. óptimos empleados en una separación determinada depende de muchos factores, incluyendo la gama de tamaños de los ácidos nucleicos que se han de separar, las composiciones de sus bases, si son de una sola cadena o de dos cadenas y de la naturaleza de las clases para las que se busca información por electroforesis. Por consiguiente, la aplicación de la invención puede requerir la prueba preliminar estándar para optimizar las condiciones para determinadas separaciones.

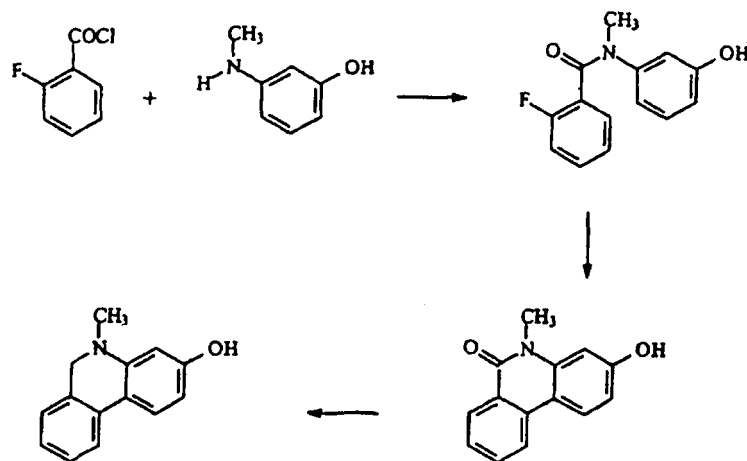
Después de la separación electroforética, se detectan los conjugados colorante-polinucleótido midiendo la emisión de fluorescencia procedente de los polinucleótidos marcados con colorante. Para realizar dicha detección, los polinucleótidos marcados se iluminan por los medios habituales, p. ej., lámparas de vapor de mercurio de alta intensidad, láseres o similares. Preferentemente el medio de iluminación es un láser que tiene un rayo de iluminación de una longitud de onda comprendida entre 488 y 550 nm. Más preferentemente, los polinucleótidos con colorante se iluminan mediante luz de láser generada por un láser de ión argón, particularmente las líneas de emisión a 488 y 514 nm de un láser de ión argón, o la línea de emisión 532 de un láser YAG de neodimio en estado sólido. En el comercio están disponibles varios láseres de ión argón que emiten simultáneamente en estas líneas, p. ej., el modelo 2001 de Cyonics, Ltd. (Sunnyvale, Calif.). Un detector sensible a la luz detecta a continuación la fluorescencia, p. ej., un tubo fotomultiplicador, un dispositivo acoplado cargado o similares.

V. Ejemplos

La invención se aclarará más mediante una consideración de los ejemplos siguientes, que se pretende que sean ejemplos puramente de la invención y de ninguna manera limiten su alcance. Todos los reactivos se adquirieron en Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) excepto que se indique de otra manera. Se preparó el anhídrido de 3,6-diclorotrimelítico como describe (Khanna). Estos ejemplos que hacen referencia al objeto que no está comprendido en las reivindicaciones son proporcionados únicamente a título comparativo.

Ejemplo 1

Síntesis de la Fórmula I

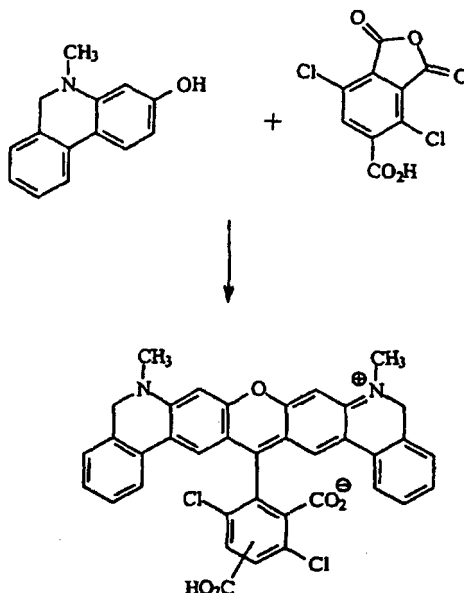


Se añadió gota a gota una solución de cloruro de o-flúor-benzofilo (1,59 g, 10 mmoles) en 2 ml de diclorometano a *m*-N-metilamino fenol (1,23 g, 10 mmoles) en 5 ml de diclorometano y trietilamina (1,01 g, 1 mmol) enfriado en un baño con hielo. Se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se diluyó la mezcla con diclorometano, se extrajo con agua y NaCl sat., se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó al vacío. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en gel de sílice para dar N-(*m*-hidroxifenil)-o-flúor-benzamida de N-metilo en forma de espuma blanca (1,2 g, 5 mmoles, 50%).

Se añadió hidróxido de sodio (200 mg, dispersión al 60% en aceite, 5 mmoles) a la amida (1,2 g, 5 mmoles) en 10 ml de dimetilformamida a temperatura ambiente. Se calentó a continuación a reflujo la mezcla durante 2 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente al vacío y se añadió 5 ml de ácido clorhídrico (2 M). Se extrajo dos veces la mezcla con acetato de etilo. Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados con agua y NaCl sat., se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en gel de sílice para dar la amida tricíclica, ciclada como un sólido blanco (0,56 g, 2,5 mmoles, 50%).

Se añadió gota a gota el complejo sulfuro de dimetilo/borano (3,75 ml, 7,5 mmoles, 2 M en THF) a la amida tricíclica (0,56 g, 2,5 mmoles) en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro enfriado en un baño con hielo. Se calentó la

mezcla a reflujo durante una hora, se enfrió en un baño con hielo y se añadió lentamente 10 ml de metanol. Se evaporó el disolvente al vacío, se añadió más metanol y se repitió la evaporación a fondo al vacío. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en gel de sílice para dar la amida tricíclica, como un sólido blanco (400 mg, 1,9 mmoles, 76%).



Se calentó a 180°C durante 2 h una mezcla de la amina tricíclica (400 mg, 1,9 mmoles), anhídrido 3,6-diclorotrimelítico (248 mg, 0,95 mmol) y ácido polifosfórico (1 g). Después de enfriar a temperatura ambiente, se disolvió el sólido en NaOH acuoso (1 M, 75 ml). Se precipitó el producto con HCl acuoso (2 M, 7,5 ml). Se recogió el sólido por filtración y se purificó por HPLC en fase inversa para dar el colorante. (Abs. máx. 638 nm). No se asignó la regioquímica de los grupos 5 y 6 carboxilo de los isómeros. El isómero 1 (32 mg, 5%) y el isómero 2 (65 mg, 10%) se pudieron separar por HPLC en fase inversa.

Ejemplo 2

Reacciones de secuenciado utilizando los terminadores didesoxinucleótido de 4,7-dicloro-rodamina descritos en la invención

Se llevaron a cabo las reacciones con terminador colorante con AmpliTaq® ADN-polimerasa, FS siguiendo los protocolos básicos en el manual del kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core (PE Biosystems). (La enzima FS es una ADN-polimerasa termoacuática recombinante que tiene dos puntos de mutaciones, G46D y F667Y). Todos los reactivos excepto la mezcla dNTP y los colorantes terminadores eran de un kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core (PE Biosystems). Se preparó una premezcla de los componentes de reacción, en la que los volúmenes están referidos a la reacción, de la forma siguiente:

5 X Tampón	4 µl
Mezcla dNTP	1 µl
Plantilla: pGEM®-3Zf(+), 0,2µg/µl	5 µl
Cebador: -21 M13 (delantero), 0,8 pmol/µl	2 µl
AmpliTaQ ADN-plimerasa, FS	0,5 µl
H ₂ O	2,5 µl

Se colocaron las reacciones en tubos de 0,5 ml para el ciclador térmico de ADN Perkin-Elmer 480 (PE Biosystems). Los volúmenes totales de reacción fueron de 20 µl, incluyendo 15 µl de la premezcla de reacción anterior, una cantidad apropiada del terminador marcado con colorante y agua. Las reacciones del terminador de colorante se colocaron con 1 pmol de terminador de colorante para los terminadores A y G, o con 15 pmol de terminador de colorante para los terminadores C y T, con los colorantes de Fórmula I. En unos pocos casos, los terminadores colorantes para C o T que estaban en una concentración demasiado baja, tal como 5 µl, produjeron menos de 15 pmoles de colorante terminador. En estos casos, se utilizó 5 µl del colorante terminador y no se añadió agua a la reacción. Se añadió 30 µl de aceite

ES 2 329 562 T3

mineral a la parte superior de cada volumen de reacción para reducir la evaporación durante el termorreciclado. Se termorreciclaron las reacciones durante 25 ciclos de la forma siguiente: 96°C durante 30 s, 50°C durante 15 s, 60°C durante 4 min; seguido de un ciclo mantenido a 4°C.

Se purificaron todas las reacciones por purificación en columna de rotación en columnas de rotación Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, NJ). El material de gel en la columna se hidrató con 0,8 mL de agua desionizada durante por lo menos 30 minutos a temperatura ambiente. Después se hidrataron las columnas y esto puso de manifiesto que ninguna burbuja estaba ocluida en el material de gel, en la tapa del extremo superior y a continuación se retiró la tapa del extremo inferior. Se dejó desaguar la columna por gravedad. Se insertaron a continuación las columnas en los tubos de lavado provistos en el kit Centi-Sep y se centrifugó en una microcentrifugadora de velocidad variable (Eppendorf modelo 5415) a $1300 \times g$ durante 2 minutos. Se separaron las columnas de los tubos de lavado y se insertaron en tubos de recogida de muestras. Se separó con cuidado la mezcla de reacción de debajo del aceite utilizando una pipeta de vidrio y se cargó en la parte superior de la columna Centi-Sep. Se centrifugaron las columnas durante 2 minutos. Se secaron las muestras en una centrifugadora al vacío.

Las muestras secas se volvieron a poner en suspensión en 25 μl de Template Supresión Reagent (PE Biosystems), se agitó, se calentó a 95°C durante 2 minutos, se enfrió en hielo, se agitó de nuevo y se centrifugó ($13.000 \times g$). Se tomaron alícuotas de 10 μl de la muestra purificada en viales de muestra y se adaptaron para su utilización en el analizador genético PE ABI PRISM™ 310 (PE Biosystems). La electroforesis en el modelo 310 utilizó un capilar de sílice fundida sin recubrir de 61 cm de longitud, 50 μm de diámetro interior con una longitud en el detector de 50 cm. Se rellenó el capilar con una solución de un polímero de tamizado (Madabhushi) de dimetilpoliacrilamida (DMA) lineal, tampón y conteniendo desnaturalizantes de ácido nucleico (PE Biosystems). Se inyectaron las muestras electrocinéticamente durante 30 s a 2,5 kV. Se realizó la electroforesis durante 2 horas a 12,2 kV con la temperatura capilar mantenida a 42°C.

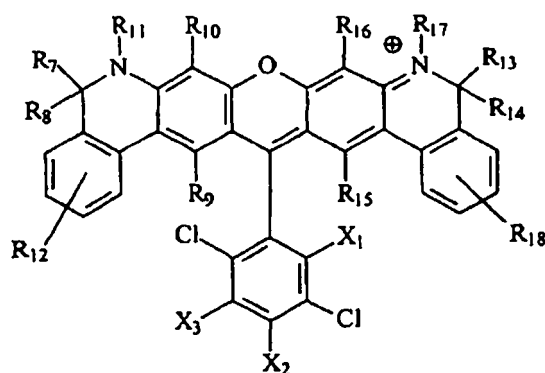
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para analizar la secuencia de un ácido nucleico, que comprende las etapas que consisten en:

(a) formar una mezcla de una primera, una segunda, una tercera y una cuarta clase de polinucleótidos mediante síntesis enzimática dirigida por plantilla utilizando nucleótidos o cebadores marcados de manera que:

- (i) cada polinucleótido en la primera clase comprende un primer colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la adenosina;
- (ii) cada polinucleótido en la segunda clase comprende un segundo colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la citidina;
- (iii) cada polinucleótido en la tercera clase comprende un tercer colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la guanosina; y
- (iv) cada polinucleótido en la cuarta clase comprende un cuarto colorante fluorescente y un nucleótido terminal 3' complementario a la timidina o uridina,

en el que los espectros de emisión de los primer, segundo, tercer y cuarto colorantes fluorescentes son resolubles entre sí y en el que además por lo menos uno de los primer, segundo, tercer o cuarto colorantes fluorescentes comprende un compuesto de 4,7-dicloro-rodamina que presenta la fórmula:



en la que:

R₇-R₁₀, R₁₂-R₁₆, y R₁₈ son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, flúor, cloro, metilo, etilo, alquilo C₁₋₈, alqueno C₂₋₈, alquino C₂₋₈, cicloalquilo, fenilo, arilo, sulfonato, sulfona, amino, amido, nitrilo, alcoxi C₁₋₈ y un enlace y/o R₇ y R₈ y/o R₁₃ y R₁₄ son considerados conjuntamente y son seleccionados de entre el grupo constituido por oxígeno, azufre, iminio y alquiliminio;

R₁₁ y R₁₇ son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₈, sulfonato de alquilo, carboxilato de alquilo, alqueno C₂₋₈, alquino C₂₋₈, cicloalquilo, fenilo, arilo y un enlace; y

X₁-X₃ son cada uno, independientemente entre sí, seleccionados de entre el grupo constituido por hidrógeno, cloro, flúor, alquilo C₁₋₈, amina, amida, carboxilato, sulfonato, hidroximetilo, y un enlace,

en el que el compuesto de 4,7-diclororodamina está unido al polinucleótido en una de las posiciones R₇-R₁₈ o X₁-X₃;

(b) separar los polinucleótidos sobre la base de sus tamaños; y

(c) identificar las clases de los polinucleótidos sobre la base de sus espectros de fluorescencia.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que X₁ es carboxilato o sulfonato.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que uno de entre X₂ y X₃ es un enlace.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₇-R₉, R₁₂-R₁₅ y R₁₈ son hidrógeno.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₇, R₈, R₁₃ y R₁₄ son metilo.

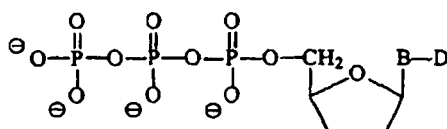
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₇ y R₈ y/o R₁₃ y R₁₄ son considerados conjuntamente y son seleccionados de entre el grupo constituido por oxígeno, azufre, iminio y alquiliminio.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₁₁ y R₁₇ son metilo o fenilo.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada uno de los primer, segundo, tercer y cuarto colorantes fluorescentes comprenden un compuesto de 4,7-dicloro-rodamina diferente como se ha definido en la reivindicación 1 que está unido al polinucleótido en una de las posiciones R₇-R₁₈ o X₁-X₃.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las primera, segunda, tercera y cuarta clases de los polinucleótidos están formadas mediante extensión enzimática de un cebador de oligonucleótidos que es complementario a una región del ácido nucleico en presencia del ácido nucleico, trifosfatos de nucleótidos adecuados para la extensión de cebador dependiente de plantilla, un primer trifosfato de nucleósidos de terminación que comprende el primer colorante fluorescente y que es complementario a la adenosina, un segundo trifosfato de nucleósidos de terminación que comprende el segundo colorante fluorescente y que es complementario a la citidina, un tercer trifosfato de nucleósidos de terminación que comprende el tercer colorante fluorescente y que es complementario a la guanosina y un cuarto trifosfato de nucleósidos de terminación que comprende el cuarto colorante fluorescente y que es complementario a la timidina o la uridina.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que los primer, segundo, tercer o cuarto trifosfatos de nucleósidos de terminación son un 2',3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfato según la fórmula:



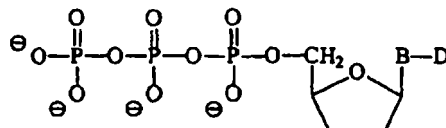
en la que:

B es una base de nucleósido/tido 7-deazapurina o purina unida al grupo azúcar a través de su posición N⁹ o una base de nucleósido/tido pirimidina unida al grupo azúcar a través de su posición N¹,

D es el compuesto de 4,7-dicloro-rodamina como se ha definido en la reivindicación 1; y

el enlace que enlaza B y D está unido en una de las posiciones R₇-R₁₈ o X₁-X₃ de manera que cuando B es una base de nucleótido purina, el enlace enlaza D a B en la posición 8 de B, cuando B es una base de nucleótido 7-deazapurina, el enlace enlaza D a B en la posición 7 de B y cuando B es una base de nucleótido pirimidina, el enlace enlaza D a B en la posición 5 de B.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que los primer, segundo, tercer y cuarto trifosfatos de nucleósidos de terminación son cada uno un 2',3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfato diferente según la fórmula:



en la que:

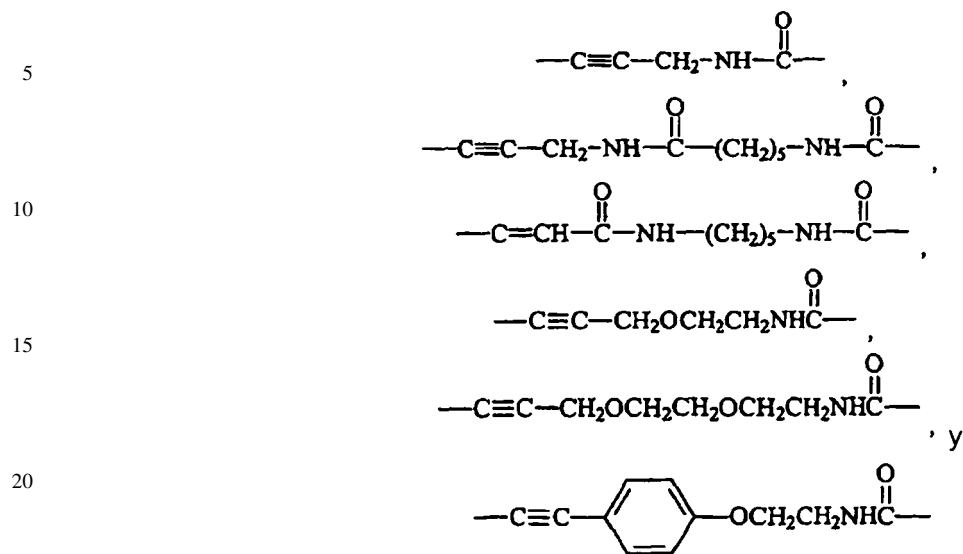
B es una base de nucleósido/tido 7-deazapurina o purina unida al grupo azúcar a través de su posición N⁹ o una base de nucleósido/tido pirimidina unida al grupo azúcar a través de su posición N¹;

D es el compuesto de 4,7-dicloro-rodamina como se ha definido en la reivindicación 1; y

el enlace que enlaza B y D está unido en una de las posiciones R₇-R₁₈ o X₁-X₃ de manera que cuando B es una base de nucleótido purina, el enlace enlaza D a B en la posición 8 de B, cuando B es una base de nucleótido 7-deazapurina, el enlace enlaza D a B en la posición 7 de B y cuando B es una base de nucleótido pirimidina, el enlace enlaza D a B en la posición 5 de B.

12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en el que el enlace es una enlace amidoacetilénico o amidoalquénico.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el enlace se selecciona de entre el grupo constituido por:



14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada una de las primera, segunda, tercera y cuarta clases de polinucleótidos están formadas mediante la extensión enzimática de un primer, un segundo, un tercer y un cuarto cebador de oligonucleótidos en presencia del ácido nucleico, los trifosfatos de nucleótidos y los trifosfatos de nucleósidos de terminación diferentes, cada uno de los cuales es complementario a una diferente de entre adenosina, citidina, guanosina y timidina o uridina, en el que los primer, segundo, tercer y cuarto cebadores de oligonucleótidos son cada uno complementario a la misma región del ácido nucleico diana y comprenden uno diferente de entre los primer, segundo, tercer y cuarto colorantes fluorescentes.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que los colorantes fluorescentes están unidos a las bases de nucleótidos de sus cebadores respectivos mediante un enlace covalente.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el enlace es un enlace amidoacetilénico o amidoalquénico.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el enlace es seleccionado de entre el grupo constituido por:

