



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 738**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07777161 .6**

96 Fecha de presentación : **17.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2032714**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54

Título: **Cebadores de oligonucleótidos modificados químicamente para la amplificación de ácido nucleico.**

30

Prioridad: **01.06.2006 US 810665 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.06.2011**

73

Titular/es: **TRILINK BIOTECHNOLOGIES**  
**9955 Mesa Rim Road**  
**San Diego, California 92121, US**

72

Inventor/es: **Zon, Gerald y**  
**Lebedev, Alexandre**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 738 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

Cebadores de oligonucleótidos modificados químicamente para la amplificación de ácido nucleico

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para amplificar ácidos nucleicos. En aspectos concretos, la invención proporciona procedimientos para amplificación de ácido nucleico de inicio en caliente.

**Antecedentes de la invención**

Se proporciona la descripción siguiente para ayudar a los conocimientos del lector. Ninguna información proporcionada o referencias citadas se admite que sea técnica anterior en la presente invención.

10 Es probable que la PCR sea el procedimiento más usado en la biología molecular y la biotecnología moderna y se está aplicando rápidamente a las pruebas genéticas, diagnósticas, forenses y de biodefensa. Kolmodin, L.A., y col., Nucleic Acid Protocols, 569-580 (2000); Budowle, B., y col., 301 Science, 1852-53 (2003); Y. Sato, y col., 5 (Suppl. 1) Legal Medicine, S191-5193 (2003); Saldanha, J., y col., 43 J. Medical Virol., 72-76 (1994); Dahiya, R., y col., 44 Biochemistry and Molecular Biology International, 407-15 (1998); y Elnifro, E.M., y col., 13 Clin. Microbiol. Rev., 559-70 (2000). La PCR se describe en las patentes de EE.UU. nº 4.683.195 y 4.683.202. En cada ciclo del procedimiento de amplificación por PCR hay varias etapas típicas. En primer lugar, la secuencia diana de ADN bicatenario se desnatura térmicamente a temperaturas elevadas (~95°C). La primera aparición de desnaturalización se denomina en el presente documento "etapa de desnaturalización inicial." A esto le sigue la hibridación de un cebador oligonucleotídico sintético a cada hebra a temperaturas menores (~ 60°C). A continuación, cada uno de estos cebadores de oligonucleótidos orientados directos e inversos se extiende desde su extremo 3' a una temperatura elevada (~70°C) mediante una ADN polimerasa térmicamente estable dependiente de iones de magnesio que incorpora 5'-desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) y genera pirofosfato (PPi), como se representa en la porción superior de la Figura 1 para el cebador oligonucleotídico directo.

15 La utilidad del PCR se debe a su capacidad para proporcionar rápidamente amplificaciones diana de ~10<sup>6</sup> veces, así como una especificidad elevada, que depende, en parte, de la especificidad de la hibridación del cebador oligonucleotídico. Por tanto, las secuencias de cebadores oligonucleotídicos y su longitud se diseñan para hibridar con únicamente la secuencia diana prevista, a las temperaturas usadas para la hibridación. No obstante, las reacciones de amplificación por PCR normalmente se preparan durante un periodo de minutos u horas a temperaturas ambientales que están muy por debajo del intervalo de temperatura necesario para asegurar la especificidad de la hibridación del cebador oligonucleotídico. En estas condiciones de preparación de muestras menos rigurosas, los cebadores oligonucleotídicos pueden unirse de forma inespecífica a otras secuencias sustancialmente no complementarias e inician potencialmente la síntesis de productos de extensión no deseados. Que se pueden amplificar junto con la secuencia diana. Como ha sido tratado por Chou, Q., y col., la amplificación de secuencias inespecíficas mediante este "cebado incorrecto" puede competir con la amplificación de las secuencias diana deseadas y, por tanto, pueden disminuir significativamente la eficiencia de la amplificación de la secuencia deseada, especialmente para dianas con un número bajo de copias. Chou, Q., y col., 20 Nucleic Acids Res., 1717-23 (1992).

25 La formación de un "dímero cebador" es otra forma problemática de hibridación inespecífica que, de acuerdo con Chou, Q., y col., es el resultado de la extensión amplificada de dos cebadores de oligonucleótidos a lo largo de otra secuencia sin una secuencia de interferencia significativa. Estos investigadores además han indicado que los dímeros cebadores pueden sufrir una oligomerización amplificada durante la PCR para crear una compleja mezcla de artefactos del cebador oligonucleotídico, cuya calidad a menudo varía de forma inversa con el rendimiento del producto específico de la PCR en amplificaciones con un número bajo de copias.

30 Aunque los problemas mencionados anteriormente por cebado incorrecto y formación de dímeros cebadores pueden encontrarse en todas las aplicaciones de PCR, estos problemas pueden suponer un reto concreto en los esquemas de PCR analítica de alta sensibilidad, tales como los usados para la detección de agentes infecciosos de transmisión por sangre (Saldanha, J., y col. and Elnifro, E.M., y col.), microbios biopeligrosos (Budowle, B., et al.), genes defectivos o cancerosos ((Dahiya, R., y col.) y ciencias forenses (Budowle, B., y col. And Y. Sato, y col.). Además, hay muchas más probabilidades de que se formen productos de amplificación falsos en la PCR multiplex. Markoulatos, P., y col., 16 J. of Clin. Laboratory Analysis, 47-51 (2002). En la PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR), el medio más sensible para la detección de una secuencia de ARN diana es usar un cebador oligonucleotídico específico del gen en la etapa de RT. Zhang, J., y col., 337 Biochem. J., 231-41 (1999); Lekanne Deprez, R.H., y col., 307 Analytical Biochem., 63-69 (2002); y Bustin, SA, y col., J. of Biomolecular Techniques, 155-66 (2004). A la luz de la importancia de estas aplicaciones de alta sensibilidad que requieren una elevada especificidad para evitar consecuencias adversas graves de "falsos negativos" y "falsos positivos", es crucial disponer de reactivos y protocolos que proporcionen ensayos que estén funcionalmente libres de artefactos debido a cebado incorrecto y formación de dímeros de cebadores.

55 Se ha investigado una serie de estrategias generales para reducir la amplificación inespecífica por PCR basada en el

procedimiento denominado "inicio en caliente" cuyo objetivo es alterar la amplificación indeseada debido al cebado incorrecto y a la formación de dímeros de cebadores oligonucleotídicos en condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente durante la preparación de la muestra. Posteriormente, la amplificación por PCR comienza cuando la mezcla para la reacción de amplificación alcanza una alta rigurosidad, temperaturas "calientes" para "iniciar" la extensión mediada por la polimerasas de los cebadores oligonucleotídicos hibridados únicamente a secuencias diana. Por tanto, la temperatura se usa para desencadenar la extensión enzimática de los cebadores oligonucleotídicos únicamente a temperaturas elevadas cuando la rigurosidad de las condiciones de hibridación del cebador/diana es óptima para especificidad.

Estas estrategias generales para el "inicio en caliente" incluyen el uso de (1) materiales sensibles a la temperatura, tales como ceras como barreras o secuestrantes para controlar la mezcla de los reactivos (Q. Chou, y col. y Tanzer, L.R., y col., 273 Anal. Biochem., 307-310 (1999)); (2) aptámeros oligonucleotídicos (Dang, C., y co., 264 J. Mol. Biol., 268-78 (1996)) o anticuerpos (Eastlund, E., y col., 2 LifeScience Quarterly, 2-5 (2001) y Mizuguchi, H., y col., 126 J. Biochem (Tokyo), 762-68 (1999)) que inhiben la función de las ADN polimerasas; (3) el uso de una segunda enzima termoestable, tal como pirofosfatasa (Clark, D.R., y col., Solicitud de Patente Internacional nº WO 2002088387) para eliminar la supresión mediante adición de pirofosfato (PPI); (4) polimerasas químicamente modificadas con reactivos hidrolíticamente reversibles tales como lisina modificada con ácido citracónico (Birch, D.E., y col., patente de EE.UU. nº 5.773.258) en AmpliTaq Gold (Moretti, T., y col., BioTechniques, 716-722 (1998) y Saldanha, J., y col.) y (5) constructos de secuencias del cebador oligonucleotídico que no favorecen el cebado incorrecto a temperatura baja, tal como secuencias competidoras (Puskas, L.G., y col., Genome Research, 309-311 (1995) o "cebadores oligonucleotídicos de tipo *touch-up and loop-incorporated*" (TULIPS-PCR) (Ailenberg, M., y col., 29(5) BioTechniques, 1018-23 (2000)).

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para amplificar ácidos nucleicos. Estos procedimientos implican el uso de cebadores oligonucleotídicos y nucleósidos en reacciones de amplificación de ácido nucleico dependientes de la temperatura. En ciertos aspectos, los procedimientos se consiguen mediante el uso de ciertos cebadores oligonucleotídicos modificados que proporcionan utilidad en la amplificación de ácido nucleico. En formas de realización preferidas, los cebadores oligonucleotídicos se modifican con ciertos grupos químicos tales como ésteres.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, en el que el procedimiento incluye amplificar ácido nucleico usando un cebador oligonucleotídico modificado, en el que el cebador oligonucleotídico modificado incluye uno o más grupos de modificación. El grupo de modificación se disocia durante la etapa de desnaturalización inicial de la amplificación. En una forma de realización, el grupo de modificación incluye uno o más de los siguientes grupos químicos de fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, Fórmula Ic, Fórmula Id, Fórmula II, Fórmula III y/o Fórmula IV como se describe más adelante en el presente documento.

En formas de realización concretas, el grupo de modificación está unido creando un enlace internucleotídico fosfotriéster (PTE). La modificación altera la extensión del cebador oligonucleotídico mediada por la ADN polimerasa antes del periodo de incubación inicial a una temperatura elevada de amplificación, como en la PCR. Los cebadores oligonucleotídicos hechos de nucleótidos y nucleósidos de la presente invención tienen dos estados. Primero, el cebador oligonucleotídico está en estado inactivo debido a la presencia de un grupo de modificación hasta que se alcanza la temperatura de desnaturalización inicial, a menudo 95°C. Después de alcanzar la temperatura de desnaturalización inicial, el cebador oligonucleotídico se activa mediante fragmentación intramolecular inducida térmicamente que convierte el oligonucleótido al segundo estado. Este segundo estado del cebador oligonucleotídico es el correspondiente cebador oligonucleotídico no modificado que tiene un enlace fosfodiéster en estado activo y se puede extender con la acción de la polimerasa. La disociación parcial o completa del grupo de modificación se produce, preferentemente, después de incubar a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 2-10 minutos. En ciertas formas de realización, la disociación del grupo de modificación del cebador oligonucleotídico se produce con respecto a la temperatura y no requiere enzimas, agentes químicos o condiciones de reacción de amplificación, como el pH. Los enlaces fosfotriéster se describen en Miller, y col., 93(24) J. Am. Chemical Society, 6657-65 (1971); Zon, y col., 6(2) Protein J., 131-45 (1987); y Koziolkiewicz, M. y Wilk, A., Protocols for Oligonucleotides and Analogs (1993).

En una forma de realización preferida, al menos un cebador de cada par de cebadores en la reacción de amplificación está marcado con un marcador detectable. Por tanto, tras la amplificación, el segmento diana se puede identificar por tamaño, captura de afinidad o color. El marcador detectable es, preferentemente, un pigmento fluorescente. En algunas formas de realización, diferentes pares de cebadores en una PCR multiplex se pueden marcar con diferentes marcadores detectables distinguibles. En otras formas de realización, el cebador directo estará marcado con un marcador detectable, mientras que el cebador inverso estará marcado con un marcador detectable diferente. El uso de diferentes marcadores detectables es útil para discriminar entre productos amplificados que son de la misma longitud o tienen una longitud muy similar. Por tanto, en una forma de realización preferida, se usan al menos dos pigmentos fluorescentes para marcar diferentes cebadores usados en una única amplificación.

En una forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención incluyen compuestos de Fórmula

I:

-L-X-R<sup>1</sup>

en la que:

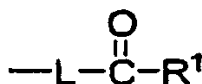
L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre

5 1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono:

X es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O), C(S) o C(O)NH; y

10 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, más preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente, el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

En una forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula la:



15

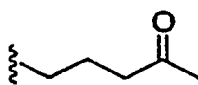
en la que:

L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre

20 1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono; y

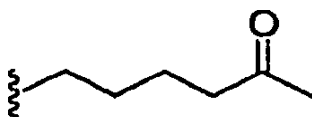
25 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, más preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente, el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

Formas de realización preferidas del grupo de modificación de Fórmula la son las siguientes:



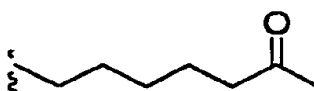
4-oxo-1-pentilo,

30

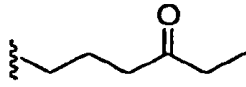


5-oxo-1-hexilo,

35

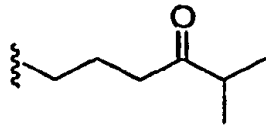


6-oxo-1-heptilo,



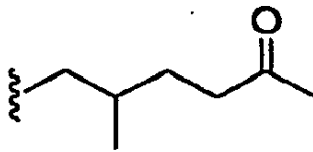
4-oxo-1-hexilo,

5



5-metil-4-oxo-1-hexilo,

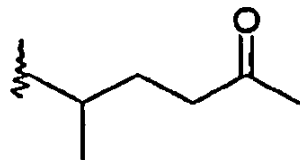
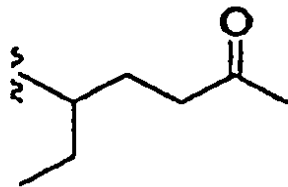
10



2-metil-5-oxo-1-hexilo,

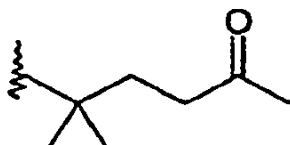
15

1-etil-4-oxo-1-pentilo,

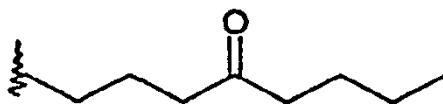


1-metil-4-oxo-pentilo,

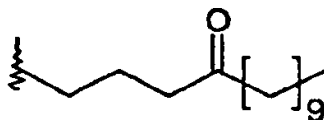
20



1,1-dimetil-4-oxo-pentilo,

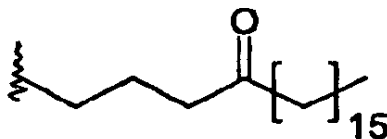


4-oxo-1-octilo,



5

4-oxo-1-tetradecilo, y



10

4-oxo-1-eicosamilo.

En una forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula Ib:



15 en la que:

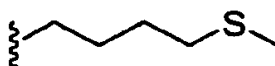
k es un número entero de 0-2;

L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre

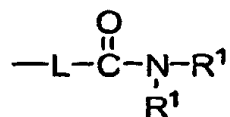
1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono; y

20 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, más preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente, el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

25 En una forma de realización preferida, el grupo de modificación de Fórmula Ib es 4-metiltio-1-butilo, que se muestra a continuación:



En una forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula IC:



30

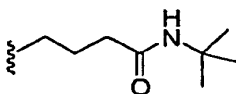
en la que:

L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre

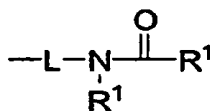
1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono; y

5 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, más preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente, el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

10 En una forma de realización preferida, el grupo de modificación de Fórmula Ic es -(N-terc-butilcarboxamido)-1-propilo, que se muestra a continuación:



15 En una forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula Id:

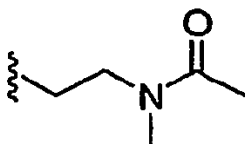


en la que:

20 L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene entre 1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono; y

25 cada R<sup>1</sup> es de forma independiente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, más preferentemente 1-6 átomos de carbono. Preferentemente, el grupo hidrocarbilo es un alquilo, alqueno o alquino que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

Formas de realización preferidas del grupo de modificación de Fórmula Id incluyen 2-(N-formil-N-metil)aminoetilo o 2-(N-acetil-N-metil)aminoetilo (que se muestra a continuación):



30 En otra forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula II:



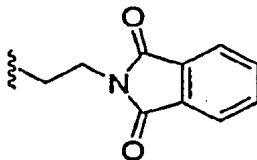
en la que:

35 L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene entre 1-10 átomos de carbono, preferentemente de 2-5 átomos de carbono, más preferentemente de 3-4 átomos de carbono, incluso más preferentemente 4 átomos de carbono; y

R<sup>2</sup> es hidrógeno, ciano o un carbociclo, heterociclo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido que tiene entre

5 y 10 átomos.

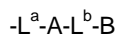
En una forma de realización preferida, el grupo de modificación de Fórmula II es N-(2-hidroxi-etil)-ftalimido, que se muestra a continuación:



5

N-(2-hidroxi-etil)-ftalimido.

En otra forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula III:



10 en la que:

La y Lb se seleccionan cada uno forma independiente de un enlace o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre 1-8 átomos de carbono, preferentemente 2-5 átomos de carbono, más preferentemente 3-4 átomos de carbono;

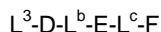
A es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Se, CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, NR<sup>3</sup>, C(O), C(S) o CNR<sup>3</sup>;

15 B es C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, OR<sup>3</sup> o SR<sup>3</sup>; y

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno de forma independiente de hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente, el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo.

20

En otra forma de realización, los grupos de modificación de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula IV:



25 L<sup>a</sup> y L<sup>b</sup> y L<sup>c</sup> se seleccionan cada uno forma independiente de un enlace o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene entre 1-8 átomos de carbono, preferentemente 2-5 átomos de carbono, más preferentemente 3-4 átomos de carbono;

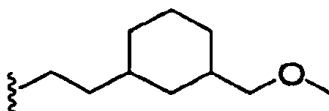
D es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, o NR<sup>5-</sup>;

E es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, o NR<sup>6-</sup>;

F es hidrógeno, C(O)R<sup>7</sup>, C(S)R<sup>7</sup>, C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, OR<sup>7</sup> o SR<sup>7</sup>;

30 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden ser, cada uno de forma independiente, hidrógeno, arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi o amino, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden cooperar para formar un anillo mono o bicíclico que consiste en 5-10 átomos de carbono e incluye D, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, E y L<sup>b</sup>, a condición de que cuando R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> cooperan para formar un anillo, n es de 0-2; y R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente, de arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, amido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo  
35 opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.

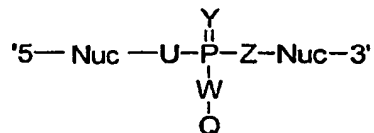
En una forma de realización de un compuesto de Fórmula IV en la que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> colaboran para formar un anillo en el que el grupo de modificación es metoximetil-ciclohex-1,3-il-etilo, que se muestra a continuación:





metoximetil-ciclohex-1,3-il-etilo.

En una forma de realización, el cebador oligonucleotídico tiene un armazón modificado de Estructura I:



5

en la que:

Nuc es un nucleósido dentro de la secuencia del cebador

U y Z son, de forma independiente, O, S, Se, NR<sup>9</sup>, o CR<sub>9</sub>R<sup>10</sup>;

10 R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> son cada uno de forma independiente de hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-10 átomos de carbono, preferentemente el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo, en el que cada uno puede incluir independientemente al menos un sustituyente seleccionado de halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, amido o un marcador detectable;

Y es O, S o Se;

15 W es cualquier resto químico que permite que Q se escinda térmicamente, por ejemplo O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Se, C(O), C(S), C(O)NH, C(N)H, NH, -C(=NR<sup>11</sup>)- o NR<sup>9</sup>;

R<sup>11</sup> es hidrógeno o hidrocarbilo opcionalmente sustituido que tiene 1-10 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono; preferentemente R<sup>11</sup> es H, alquilo o alquilo inferior; y

Q es un grupo de modificación que comprende uno o más grupos térmicamente escindibles.

20 En una forma de realización, el grupo de modificación Q incluye uno o más grupos térmicamente escindibles seleccionados de las Fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, II, III o IV como se ha definido en el presente documento.

También se divulga un cebador oligonucleotídico para amplificación de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico en el que la secuencia de ácido nucleico tiene uno o más grupos de modificación. El grupo de modificación incluye uno o más de los siguientes grupos químicos de fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, Fórmula Ic, Fórmula Id, Fórmula II, Fórmula III y/o Fórmula IV como se describe más adelante en el presente documento.

25 También se divulga un procedimiento de fabricar cebadores oligonucleotídicos modificados y nucleótidos modificados para ácido nucleico que incluye realizar la síntesis de oligonucleótidos con fosforoamiditas modificadas en el que las fosforoamiditas modificadas comprenden uno o más de los siguientes grupos de modificación de Fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, Fórmula Ic, Fórmula Id, Fórmula II, Fórmula III y/o Fórmula IV como se describe más adelante en el presente documento.

30 Los kit que comprenden oligonucleótidos modificados para realizar amplificaciones también se describen en el presente documento. El kit puede incluir un recipiente marcado para amplificación de ácido nucleico, instrucciones para realizar la amplificación de ácido nucleico y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en dNTP, polimerasa de ácido nucleico, magnesio y tampón de reacción.

35 Los procedimientos de la presente invención para amplificación de ácido nucleico son útiles en aplicaciones que emplean cebadores oligonucleotídicos sintéticos y extensión mediante polimerasa del ácido nucleico. Los cebadores oligonucleotídicos pueden tener un único sitio de modificación o múltiples sitios de modificación.

40 De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que los oligonucleótidos modificados tal como se divulgan en el presente documento tienen ventajas significativas. Por ejemplo, el usuario final puede usar los mismos protocolos y procedimientos de amplificación ya en uso con cebadores oligonucleotídicos sin modificar. Los cebadores oligonucleotídicos modificados tal como se divulgan en el presente documento son compatibles con los sistemas y reactivos de amplificación existentes (incluida la PCR de inicio en caliente), no se necesitan enzimas o reactivos adicionales y se pueden usar los procedimientos de síntesis de cebadores oligonucleotídicos para sintetizar los cebadores oligonucleotídicos modificados divulgados en el presente documento. Otros aspectos incluyen productos comerciales para esta tecnología, que incluyen fosforoamiditas modificadas por PTE, soportes sólidos modificados por

PTE para la síntesis de oligonucleótidos, conjuntos de cebadores oligonucleotídicos para dianas habitualmente amplificadas y secuencias de cebadores oligonucleotídicos sintetizados habituales. Las aplicaciones en amplificación basada en la polimerasas que emplean cebadores oligonucleotídicos que requieren fidelidad se pueden usar con los cebadores oligonucleotídicos modificados divulgados en el presente documento. Las aplicaciones en amplificación incluyen, entre otras, reacción en cadena de la polimerasa, PCR de inicio en caliente, PCR con transcripción inversa (RT-PCR), PCR multiplex, PCR cuantitativa (Q-PCR), secuenciación u otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica.

En ciertas formas de realización de los procedimientos proporcionados en el presente documento, la amplificación se realiza mediante transcriptasa inversa (RT). Un experto habitual en la técnica está familiarizado con las condiciones necesarias para realizar la RT. Las temperaturas de desnaturalización y extensión pueden variar y depender de la enzima transcriptasa inversa que se esté usando. Por ejemplo, la desnaturalización y la extensión mediante la transcriptasa inversa se produce a aproximadamente 37-70°C. Los grupos de modificación proporcionados en el presente documento se pueden seleccionar para usar de acuerdo con una condición de disociación deseada, tal como una temperatura concreta, o una temperatura concreta junto con un marco de tiempo concreto. Por ejemplo, se pueden usar para la RT grupos de modificación de modo que el grupo se disocia a 37-70°C, preferentemente 37-60°C; preferentemente a aproximadamente 50°C; preferentemente a aproximadamente 42°C y, preferentemente, a aproximadamente 37°C. En otras formas de realización, el grupo de modificación se disocia en 0,1-60 minutos; preferentemente 1-30 minutos; preferentemente 1-15 minutos; preferentemente 1-10 minutos; preferentemente 0,1-5 minutos a la temperatura deseada.

En otras formas de realización de los procedimientos proporcionados en el presente documento, la amplificación puede ser una o más de una reacción de amplificación en una única mezcla de reacción, tal como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) u otros ejemplos, tales como los descritos en la patente de EE.UU. nº 6.399.304. En ciertas formas de realización, se pueden añadir reactivos necesarios para más de una reacción enzimática y llevarse a cabo en un único vaso de reacción. En dichas reacciones, se pueden usar varias combinaciones de oligonucleótidos modificados y/o sin modificar. Por ejemplo, se podrían usar oligonucleótidos modificados para una, una o más, dos o más, tres o más, cinco o más, diez o más de las reacciones. En un caso, un oligonucleótido con un grupo de modificación podría usarse para la transcriptasa inversa que se disocia a temperaturas ideales para RT, de modo que se puedan usar 42°C y otro oligonucleótido con un grupo de modificación diferente para la PCR que se disocia a temperaturas ideales para la PCR, tal como 95°C. Proporcionando dicha combinación, los cebadores para la PCR no interfieren o no interfieren sustancialmente con la reacción RT. Como alternativa, los cebadores para RT pueden ser cebadores no modificados y los cebadores para RT pueden estar modificados con un grupo que se disocia a temperaturas ideales para la PCR, tal como 95°C. En otras formas de realización más, la posterior PCR incluye PCR multiplex, PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

En otras formas de realización determinadas de los procedimientos proporcionados en el presente documento, la amplificación comprende una o más de una reacción de amplificación en una única mezcla de reacción, tal como PCR multiplex. Los cebadores usados para amplificar diferentes regiones diana pueden estar incluidos en la misma reacción. En dichas reacciones, se pueden usar diferentes combinaciones de cebadores modificados y/o no modificados para cada región diana. Al usar diferentes combinaciones de cebadores no modificados y/o modificados se pueden controlar las eficiencias relativas de la amplificación mediante el uso de diferentes grupos de modificación. Por ejemplo, un cebador para una primera región de ácido nucleico diana puede no tener un grupo de modificación, mientras que un cebador para una segunda región diana tiene un grupo de modificación, en el que la primera región diana se amplifica con menor eficiencia que la segunda región diana en las mismas condiciones. Como alternativa, un cebador para una primera región diana podría tener un grupo de modificación y un cebador para una segunda región diana podría tener un grupo de modificación diferente, en el que los grupos de modificación tienen diferentes tasas de disociación. En otra alternativa, con el fin de controlar la eficiencia de la amplificación se puede usar una población mixta de un cebador modificado y su equivalente sin modificar. En otras formas de realización todavía más preferidas, la reacción de PCR multiplex amplifica dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más o veinte o más regiones diana diferentes. Cualquier combinación de cebadores no modificados y modificados se puede usar para cada región diana, preferentemente una, dos, dos o más, tres o más, cinco o más, diez o más o veinte o más regiones diana diferentes. Por ejemplo, cuando se amplifican tres regiones diana, una región diana puede usar cebadores no modificados y la segunda y la tercera región diana pueden usar cebadores modificados, en las que los cebadores para la segunda y la tercera regiones diana pueden usar los mismos o diferentes grupos de modificación y en las que un cebador de una secuencia de nucleótidos (es decir, el cebador directo para una primera región diana), también puede ser una mezcla de cebadores modificados y su equivalente a cebador no modificado. Un experto en la técnica sería capaz de determinar qué combinación de cebadores y grupos de modificación será adecuada dependiendo de factores tales como las eficiencias de disociación de un grupo de modificación, la eficiencia de amplificación y el número de regiones diana.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificación" o "amplificar" se refiere a uno o más procedimientos conocidos en la técnica para copiar un ácido nucleico diana, de modo que se incrementa el número de copias de una

secuencia de ácido nucleico selecciona. La amplificación de la presente invención emplea cebadores oligonucleotídicos sintéticos con extensión por la ácido nucleico polimerasa, incluida la transcriptasa inversa (RT). La amplificación puede ser exponencial o lineal. Un ácido nucleico diana puede ser ADN, ARN, ADNc o un molde de ácido nucleico modificado. Aunque los procedimientos de ejemplo descritos en lo sucesivo en el presente documento se refieren a la amplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), en la técnica se conocen otros numerosos procedimientos para amplificar ácidos nucleicos. Por ejemplo, los procedimientos incluyen procedimientos isotérmicos, procedimientos en círculo rodante, PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR multiplex, secuenciación de ADN y otras reacciones de extensión de ácido nucleico. El experto en la técnica entenderá que se pueden usar otros procedimientos en lugar de, o junto con, los procedimientos de PCR. Véase, por ejemplo, Saiki, "Amplification of Genomic DNA" in PCR Protocols, Innis y col., eds., Academic Press, San Diego, CA, 13-20 (1990); Wharam, y col., 29(11) Nucleic Acids Res, 20 E54-E54 (2001); Hafner, y col., 30(4) Biotechniques, 852-6, 858, 860 passim (2001); and Zhong, y col., 30(4) Biotechniques, 852-56, 858, 860 passim (2001).

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refieren a nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos o cualquier fragmento de los mismos, o a moléculas naturales o sintéticas. Estas frases también se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios o pueden representar la hebra sentido o antisentido, o a cualquier material de tipo ADN o de tipo ARN. Un "equivalente de ARN" en referencia a una secuencia de ADN está compuesto por la misma secuencia lineal de nucleótidos que la secuencia de ADN de referencia, con la excepción de que todas las bases nitrogenadas que sean timina están sustituidas por uracilo y el armazón de azúcar está compuesto por ribosa en lugar de por desoxirribosa, Armazones de ácido nucleico alternativos adicionales adecuados para la invención incluyen, entre otros, fosforotioato, fosforoselenoato, fosfonato de alquilo, fosfonato de arilo, ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y ácidos peptidonucleicos (APN) y boronato. En los procedimientos descritos en el presente documento se puede usar ARN y/o se puede convertir en ADNc mediante transcripción inversa para usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido modificado" se refiere a un cebador oligonucleotídico que tiene al menos un grupo de modificación. Los oligonucleótidos modificados incluyen, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un nucleósido modificado, un oligonucleótido que contiene un enlace internucleotídico modificado, o un oligonucleótido que tiene cualquier combinación de nucleósidos modificados y enlaces internucleotídicos (incluso cuando hay presente un nucleósido natural en la cadena de oligonucleótidos). Oligonucleótidos cuyos nucleósidos están conectados a través de enlaces internucleotídicos modificados se pueden encontrar en, por ejemplo, Waldner y col., 6 Bioorg. Med. Chem. Letters, 2363-66 (1996), que describen la síntesis de oligonucleótidos que contienen varios enlaces internucleotídicos amida.

Como se usa en el presente documento, los términos "oligonucleótido" "cebador" o "cebador oligonucleotídico" se refiere a un polinucleótido, normalmente monocatenario, que puede ser natural o sintético, compuesto normalmente por una secuencia entre aproximadamente 5 a 50 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos o más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos. Los oligonucleótidos incluyen ADN o ARN. El experto en la técnica es capaz de diseñar y preparar cebadores que son adecuados para amplificar una secuencia diana. La longitud de la secuencia de hibridación del cebador de los cebadores de amplificación para usar en la presente invención depende de varios factores, incluidos la identidad de secuencia de nucleótidos, la complementariedad y la temperatura a la cual estos ácidos nucleicos hibridan o se usan durante la amplificación de ácido nucleico un vitro. Las consideraciones necesarias para determinar una longitud preferida para la secuencia de hibridación del cebador de un cebador de amplificación de una identidad de secuencia concreta son bien conocidas para el experto en la técnica. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido corto puede estar relacionada con su especificidad o selectividad de hibridación.

Como se usa en el presente documento, "grupo de modificación" se refiere a un resto químico unido a un cebador oligonucleotídico. En ciertas formas de realización, el resto químico es un éster. Un cebador oligonucleotídico que comprende uno o más grupos de modificación de la presente invención tiene una eficacia reducida para la extensión de ácidos nucleicos. Preferentemente, la extensión está alterada cuando el estado inactivo de un cebador oligonucleotídico modificado es al menos un 50% menos eficaz en el cebado de una reacción de amplificación que su correspondiente oligonucleótido en el estado activo, preferentemente al menos un 60% menos eficaz, preferentemente un 70% menos eficaz, más preferentemente al menos un 80% menos eficaz, más preferentemente un 90% menos eficaz e incluso más preferentemente un 95% menos eficaz en el cebado de una reacción de amplificación que su correspondiente cebador oligonucleotídico en el estado activo. Un experto habitual en la técnica es capaz de determinar con facilidad el nivel de actividad y eficacia. Un experto habitual en la técnica conoce muchos modos de investigar la capacidad de cebado. Un procedimiento de determinar la eficacia del cebado se ilustra en el Ejemplo 4 Randall, S.K. y col., 262 J. Biological Chemistry, 6864-70 (1987).

Preferentemente, los grupos de modificación son termolábiles y se disocian de un oligonucleótido modificado a una tasa creciente a medida que se eleva la temperatura del medio de la reacción de amplificación. El grupo de

modificación puede estar entre dos nucleótidos adyacentes.

5 Como se usa en el presente documento, el término “terminal” con respecto al oligonucleótido se refiere a los nucleótidos en o cerca del extremo 3' o 5' de un oligonucleótido. Preferentemente, el terminal de un oligonucleótido incluye los últimos 6 nucleótidos, más preferentemente los últimos 5 nucleótidos, más preferentemente los últimos 4 nucleótidos, más preferentemente los últimos 3 nucleótidos, más preferentemente los últimos 2 nucleótidos o más preferentemente el último nucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término “disociar” o “disociación” se refiere a la separación de un grupo de modificación de un oligonucleótido. La disociación puede ser parcial o completa.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “enlace internucleotídico” se refiere al enlace entre dos nucleótidos de un cebador oligonucleotídico.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “secuencia de ácido nucleico diana” o “ácido nucleico diana” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se va a identificar.

15 Como se usa en el presente documento, “marcadores” o “marcadores detectables” se refiere a cualquier molécula (o combinaciones de moléculas) que se pueden unir a o asociar con una molécula de modo que la molécula se pueda detectar de forma indirecta a través de la detección del marcador detectable. Un marcador detectable puede ser u radioisótopo (p. ej., yodo, indio, azufre, hidrógeno etc.), un pigmento o fluoróforo (p. ej., cianina, fluoresceína, rodamina), proteína (p. ej., avidina, anticuerpo), enzima (peroxidasa, fosfatasa, y similares), haptenos (p. ej., biotina) o cualquier otro agente que se pueda detectar directa o indirectamente. Una enzima es un ejemplo de un marcador detectable detectado por medios indirectos. En este caso, la enzima está unida al ácido nucleico diana y la presencia de la enzima se detecta mediante la adición de un sustrato adecuado que cuando actúa sobre él la enzima hace que el sustrato cambie de color o libere un producto de escisión que proporcione un color diferente del que tiene el sustrato original.

20

25 Como se usa en el presente documento, “inducción térmica” se refiere a un proceso por el cual la modificación del cebador oligonucleotídico se elimina del cebador oligonucleotídico generando un cebado oligonucleotídico en estado activo aplicando calor, convirtiéndolo de este modo en extensible por las polimerasas.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “inicio en caliente” se refiere a una reacción de amplificación de ácido nucleico en la que la amplificación del ácido nucleico inducida por la polimerasa está alterada hasta que la reacción alcanza una temperatura inicial por encima de la temperatura de extensión de la enzima. En las aplicaciones de la PCR de inicio en caliente, las temperaturas iniciales alcanzan valores entre aproximadamente 80 y 105°C o hasta que la reacción de amplificación alcanza una temperatura inicial de al menos aproximadamente 80°C o hasta que la reacción de amplificación alcanza una temperatura inicial de al menos aproximadamente 85°C o hasta que la reacción de amplificación alcanza una temperatura inicial de al menos aproximadamente 90°C o hasta que la reacción de amplificación alcanza una temperatura inicial de al menos aproximadamente 95°C. La expresión “inicio en caliente” es bien conocida en la técnica y se conoce una serie de procedimientos que alteran la amplificación tales como polimerasas modificadas, oligonucleótidos con estructuras secundarias que afectan a la hibridación y reactivos contenidos en barreras sensibles a la temperatura tales como ceras. En una forma de realización preferida, la amplificación de inicio en caliente está producida por la eliminación inducida por calor de un grupo de modificación de oligonucleótido.

35

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “fragmentación intramolecular” se refiere al procedimiento en el que el grupo de modificación se disocia de un cebador oligonucleotídico modificado. Preferentemente, el oligonucleótido resultante está en un estado activo.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “cebado incorrecto” se refiere a la unión de un cebador oligonucleotídico inespecífico. En particular, las secuencias que tienen una falta de complementariedad sustancial y que potencialmente inician síntesis de productos de extensión no deseados que se pueden amplificar junto con la secuencia diana.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “estado inactivo” o “inactivo” en el contexto de un cebador oligonucleotídico se refiere a un cebador oligonucleotídico con un grupo de modificación. En una forma de realización, el grupo de modificación altera la hibridación del cebador oligonucleotídico a una secuencia diana. En otra forma de realización, el grupo de modificación altera la extensión de la polimerasa cuando el cebador oligonucleotídico hibrida con otra secuencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión “estado activo” o “activo” en el contexto de un cebador oligonucleotídico se refiere a un cebador oligonucleotídico sin un grupo de modificación. Preferentemente, un cebador oligonucleotídico activo tiene 1) un enlace fosfodiéster no modificado y 2) un resto de base no modificada y es capaz de extender la cadena para usar en reacciones de amplificación. Un cebador oligonucleotídico activo puede ser un

cebador oligonucleotídico que nunca ha tenido un grupo de modificación o un cebador oligonucleotídico del que se ha eliminado un grupo de modificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dímero cebador" se refiere a la hibridación inespecífica del cebador oligonucleotídico que es el resultado de la extensión amplificada de dos cebadores oligonucleotídicos a lo largo de la secuencia de ambos sin una secuencia de interferencia significativa.

Como se usa en el presente documento, el término "hibridar" o la expresión "hibridar de forma específica" se refiere a un procedimiento en el que dos hebras complementarias de ácido nucleico hibridan entre sí en condiciones rigurosas adecuadas. Normalmente se prefieren hibridaciones a ácidos nucleicos diana y preferentemente se realizan con moléculas de ácido nucleico de longitud de sonda, preferentemente de 20-100 nucleótidos de longitud. En la técnica se conocen bien las técnicas de hibridación de ácido nucleico. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. (1994).

Como se usa en el presente documento, la expresión "condición rigurosa de hibridación" se refiere a las condiciones de hibridación que no permiten la hibridación de dos ácidos nucleicos que no sean completamente complementarios.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" o la expresión "muestra problema" se refiere cualquier material líquido o sólido que se cree que está compuesto por los ácidos nucleicos de interés. Una muestra problema se puede obtener de cualquier fuente biológica (es decir, una muestra biológica), tal como células en cultivo o una muestra de tejido o producida sintéticamente, incluida un molde sintetizado químicamente.

Como se usa en el presente documento, los términos "complemento", "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos tal como un oligonucleótido o un ácido nucleico diana) de acuerdo con las normas estándar de apareamiento de Watson/Crick. Una secuencia complemento también puede ser una secuencia de ARN complementaria a la secuencia de ADN o su secuencia complemento, y también puede ser un ADNc. Por ejemplo, para la secuencia 5'-A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'." Ciertos nucleótidos que no se encuentran habitualmente en los ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos descritos en el presente documento; estos incluyen nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados, tales como inosina, 7-deazaguanina, ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y ácidos peptidonucleicos (APN). La complementariedad no tiene que ser perfecta, dúplex estables pueden contener pares de bases apareadas incorrectamente, degeneradas o bases sin aparear. Los expertos en la técnica de la tecnología de los ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad del dúplex empíricamente considerando una serie de variables incluidas, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición en bases y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases apareadas incorrectamente.

La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases nucleotídicas de dos hebras de ácido nucleico están apareadas de acuerdo con las normas de apareamiento de bases. La complementariedad puede ser "completa" o "total", en la que todas las bases nucleotídicas de dos hebras de ácido nucleico están apareadas de acuerdo con las normas de apareamiento de bases. La complementariedad puede estar ausente, en la que ninguna de las bases nucleotídicas de dos hebras de ácido nucleico están apareadas de acuerdo con las normas de apareamiento de bases. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos. Cualquier término se puede usar en referencia a nucleótidos individuales, especialmente dentro del contexto de polinucleótidos. Por ejemplo, un nucleótido concreto dentro de un oligonucleótido puede observarse por su complementariedad, o ausencia de la misma, con un nucleótido dentro de otra hebra de ácido nucleico, en contraste o comparación con la complementariedad entre el resto del oligonucleótido y la hebra de ácido nucleico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "sustancialmente complementarios" se refiere a dos secuencias que hibridan en condiciones rigurosas de hibridación. El experto en la técnica entenderá que las secuencias sustancialmente complementarias no tienen que hibridan en toda su longitud. En particular, las secuencias sustancialmente complementarias comprenden una secuencia contigua de bases que no hibridan con una secuencia diana, en posición 3' o 5', con una secuencia contigua de bases que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador directo" se refiere a un cebador oligonucleotídico que hibrida con la hebra antisentido de ARN monocatenario, ADN monocatenario o ADN bicatenario. Un "cebador inverso" hibrida con una hebra sentido de ARN monocatenario, ADN monocatenario o ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, un cebador oligonucleotídico es "específico" de un ácido nucleico si la secuencia de hibridación de cebador oligonucleotídico del cebador oligonucleotídico tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con una porción del ácido nucleico cuando el cebador oligonucleotídico y el ácido nucleico

están alineados. Un cebador oligonucleotídico que es específico de un ácido nucleico es uno que, en las condiciones adecuadas de hibridación o lavado, es capaz de hibridar con la diana de interés y no hibridar sustancialmente con ácidos nucleicos que no son de interés. Se prefieren niveles más elevados de identidad de secuencia e incluyen al menos 75%, al menos 80%, al menos 90% y al menos 95% y más preferentemente al menos 98% de identidad de secuencia.

5

Como se usa en el presente documento, el término “nucleósido” incluye todos los nucleósidos modificados y naturales, incluidas todas las formas de furanósidos encontradas en los ácidos nucleicos. Nucleósidos naturales incluyen, por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, timidina y uridina.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “análogos de nucleósido”, “nucleósidos modificados” o “derivados de nucleósidos” incluyen nucleósidos sintéticos como se describe en el presente documento. Derivados de nucleósidos también incluyen nucleósidos que tienen restos de base modificada, con o sin grupos protectores. Dichos análogos incluyen, por ejemplo, desoxinosina, 2,6-diaminopurina-2'-desoxiribosa, 5-metil-2'-desoxicitidina y similares. Los anillos de bases más frecuentes en los nucleósidos naturales son anillos de purina y de pirimidina. Entre los anillos de purina naturales se incluyen adenina, guanina y N<sup>6</sup>-metiladenina. Entre los anillos de purina naturales se incluyen citosina timina y 5-metilcitosina. Los compuestos y procedimientos de la presente invención incluyen anillos de base y análogos sintéticos de los mismos, así como azúcares de bases no naturales sustituidos con heterociclo e incluso azúcares de base sustituidos acíclicos. Además, derivados nucleosídicos incluyen otros derivados de purina y pirimidina, por ejemplo purinas sustituidas con halógeno (p. ej., 6-fluoropurina), pirimidinas sustituidas con halógeno, N<sup>6</sup>-etiladenina, N<sup>6</sup>-(alquil)-citosinas, 5-etilcitosina y similares. Derivados de nucleósidos y análogos abarcan una gran variedad de modificaciones, tales como las descritas en la patente de EE.UU. 6.762.298.

10

15

20

Como se usa en el presente documento, el término “acilo” indica grupos  $-C(O)R^a$ , en los que R<sup>a</sup> es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituidos y similares como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “acilo sustituido” indica el grupo  $-C(O)R^a$ , en el que R<sup>a</sup> es alquilo inferior sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido y similares.

25

Como se usa en el presente documento, el término “aciloxi” indica el grupo  $-OC(O)R^b$ , en el que R<sup>b</sup> es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “alquenilo” significa un hidrocarbilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene uno o más dobles enlaces y que, a menos que se indique lo contrario, contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono y más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Ejemplos de radicales alquenilo incluyen vinilo, alilo, 1,4-butadienilo, isopropenilo y similares.

30

Como se usa en el presente documento, el término “alquenilarilo” se refiere a grupos arilo sustituidos con alquenilo u “alquenilarilo sustituido” se refiere a grupos alquenilarilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

35

Como se usa en el presente documento, el término “alquenileno” se refiere a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que normalmente contienen 2-20 átomos de carbono, preferentemente 2-12 átomos de carbono, preferentemente 2-8 átomos de carbono, y “alquenileno sustituido” se refiere a grupos alquenileno que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

40

Como se usa en el presente documento, el término “alquilo” se refiere a una cadena de carbonos unidos por enlace sencillos, que normalmente varía de 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-8 átomos de carbono, ejemplos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo y similares. Ejemplos de tales radicales alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, iso-amilo, hexilo, octilo, dodecanilo y similares.

45

Como se usa en el presente documento, la expresión “alquilo inferior” se refiere a una cadena lineal o una cadena ramificada de carbonos que normalmente varía de 1-6 átomos de carbono, preferentemente 2-5 átomos de carbono. Ejemplos incluyen etilo, propilo, isopropilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “alquileno” se refiere a un hidrocarbilo divalente que contiene 1-20, preferentemente 1-15 átomos de carbono, de cadena lineal o ramificada, de la que se toman dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de diferentes átomos de carbono. Ejemplos de alquileno incluyen, entre otros, metileno ( $-CH_2-$ ), etileno ( $-CH_2CH_2-$ ), y similares.

50

Como se usa en el presente documento, el término “alquinilo” significa un hidrocarbilo de cadena lineal o de cadena

ramificada que tiene uno o más triples enlaces y que contiene aproximadamente 2-20 átomos de carbono, preferentemente aproximadamente 2-10 átomos de carbono, más preferentemente aproximadamente 2-8 átomos de carbono y más preferentemente aproximadamente 2-6 átomos de carbono. Ejemplos de radicales alquinilo incluyen etinilo, propinilo (propargilo), butinilo y similares.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “alquinilarilo” se refiere a grupos arilo sustituidos con alquinilo y “alquinilarilo sustituido” se refiere a grupos alquinilarilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, el término “alcoxi” indica el grupo  $-OR^c$ , en el que  $R^c$  es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, heteroalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido tal como se ha definido.

Como se usa en el presente documento, el término “alcoxi inferior” indica el grupo  $OR^d$ , en el que  $R^d$  es alquilo inferior.

Como se usa en el presente documento, el término “alquilarilo” se refiere a grupos arilo sustituidos con alquilo y “alquilarilo sustituido” se refiere a grupos alquilarilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

- 15 Como se usa en el presente documento, la expresión “alquilcarbonilamino” indica el grupo  $-NR^eC(O)R^f$ , en el que  $R^e$  es alquilo opcionalmente sustituido y  $R^f$  es hidrógeno o alquilo inferior.

Como se usa en el presente documento, el término “alquilsulfinilo” indica el grupo  $-S(O)R^g$ , en el que  $R^g$  es alquilo opcionalmente sustituido.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término “alquilsulfonilo” indica el grupo  $-S(O)_2R^g$ , en el que  $R^g$  es alquilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “alquilsulfonilamino” indica el grupo  $-NR^eS(O)_2R^f$ , en el que  $R^e$  es alquilo opcionalmente sustituido y  $R^f$  es hidrógeno o alquilo inferior.

Como se usa en el presente documento, el término “alquiltio” se refiere al grupo  $-S-R^h$ , en el que  $R^h$  es alquilo inferior o alcoxi.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término “alquiltio sustituido” se refiere al grupo  $-S-R^i$ , en el que  $R^i$  es alquilo inferior sustituido o alcoxi.

30 Como se usa en el presente documento, el término “alquinileno” se refiere a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono y que normalmente tienen en el intervalo de aproximadamente 2-12 átomos de carbono, preferentemente 2-8 átomos de carbono, y “alquinileno sustituido” se refiere a grupos alquinileno que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “amido” indica el grupo  $-C(O)NR^jR^k$ , en el que  $R^j$  y  $R^k$  pueden ser de forma independiente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido como se define en el presente documento.

- 35 Como se usa en el presente documento, la expresión “amido sustituido” indica el grupo  $-C(O)NR^kR^k$ , en el que  $R^k$  y  $R^k$  son de forma independiente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, no obstante, con la condición de que al menos uno de  $R^k$  y  $R^k$  no sea hidrógeno.  $R^kR^k$  en combinación con el nitrógeno pueden formar un anillo heterocíclico o heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “amidino” indica el grupo  $-C(=NR^m)NR^mR^m$ , en el que  $R^m$ ,  $R^m$  y  $R^m$  son de forma independiente hidrógeno o alquilo inferior opcionalmente sustituido.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término “amino” o amino sustituido indica el grupo  $-NR^nR^n$ , en el que  $R^n$  y  $R^n$  pueden ser de forma independiente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido como se define en el presente documento, acilo o sulfonilo. Una “amina divalente” indica el grupo  $NH-$ . Una “amina divalente sustituida” indica el grupo  $NR-$  en el que  $R$  es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, acilo, acilo sustituido, sulfonilo o sulfonilo sustituido.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión “amino sustituido” o “amina sustituida” indica el grupo  $-NR^pR^p$ , en el que  $R^p$  y  $R^p$  son de forma independiente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, acilo, acilo sustituido, sulfonilo o sulfonilo sustituido, no obstante, con la condición de que al menos uno de  $R^p$  y  $R^p$  no sea hidrógeno.  $R^pR^p$  en combinación con el nitrógeno pueden formar un anillo heterocíclico o heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “arilalquinilo” se refiere a grupos alquinilo sustituidos con arilo y “arillquinilo sustituido” se refiere a grupos arilalquinilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, el término “aralquilo” significa alquilo como se ha definido en el presente documento, en el que un átomo de hidrógeno alquilo está sustituido con un arilo tal como se ha definido en el presente documento. Ejemplos de radicales aralquilo incluyen bencilo, fenetilo, 1-fenilpropilo, 2-fenilpropilo, 3-fenilpropilo, 1-naftilpropilo, 2-naftilpropilo, 3-naftilpropilo, 3-naftilbutirilo y similares.

10 Como se usa en el presente documento, el término “aroílo” se refiere a especies de aril-carbonilo tal como benzoílo y “aroílo sustituido” se refiere a grupos aroílo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “arilalquilo” se refiere a grupos alquinilo sustituidos con arilo y “arilalquilo sustituido” se refiere a grupos arilalquilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

15 Como se usa en el presente documento, el término “arilo” solo o en combinación significa fenilo o naftilo opcionalmente carbocíclico condensado con un cicloalquilo de, preferentemente, 5-7, más preferentemente 5-6, miembros de anillo y/o opcionalmente sustituido con de 1 a 3 grupos o sustituyentes de halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono o disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo  
20 heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino o similares. Como se usa en el presente documento, el término “arilcarbonilamino” indica el grupo  $-NR^qC(O)R^f$ , en el que  $R^q$  es hidrógeno o alquilo inferior y  $R^f$  es arilo opcionalmente sustituido.

25 Como se usa en el presente documento, el término “arileno” se refiere a grupos aromáticos divalentes que normalmente tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y “amileno sustituido” se refiere a grupos amileno que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “ariloxi” indica el grupo  $-OAr$ , en el que Ar es un grupo arilo o arilo sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “arilsulfonilamino” indica el grupo  $-NR^qS(O)_2R^f$ , en el que  $R^q$  es hidrógeno o alquilo inferior y  $R^f$  es arilo opcionalmente sustituido.

30 Como se usa en el presente documento, en referencia a “un grupo carbamato” abarca los sustituyentes de la estructura  $-O-C(O)-NR^2$ , en el que cada R es de forma independiente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se ha establecido en el presente documento.

35 Como se usa en el presente documento, en referencia a “un grupo ditiocarbamato” abarca los sustituyentes de la estructura  $-S-C(S)-NR^2$ , en el que cada R es de forma independiente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se ha establecido en el presente documento.

40 Como se usa en el presente documento, el término “carbociclo” significa un grupo saturado, insaturado o aromático que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados compuestos por átomos de carbono unidos. El o los anillos puede, opcionalmente, estar insustituidos o sustituidos con, por ejemplo, halógeno, alquilo inferior, alcoxi, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “cicloalquenilo” se refiere a grupos cíclicos que contienen anillos que contienen en el intervalo de 3 hasta 20 átomos de carbono y que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y “cicloalquenilo sustituido” se refiere a grupos cicloalquenilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, el término “cicloalquilo” se refiere a un grupo alquilo monocíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono y “cicloalquilo sustituido” se refiere a grupos cicloalquilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

50 Como se usa en el presente documento, el término “cicloalquileno” se refiere a grupos divalentes que contienen anillos que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono y “cicloalquileno sustituido” se refiere a grupos cicloalquileno que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “guanidinilo” se refiere a la estructura  $N=C(NH_2)_2$  y “guanidinilo



sustituido” se refiere a la estructura  $N=C(NH_2)_2$ , en la que cada R es de forma independiente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se ha establecido en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “halógeno” o “halo”, solo o en combinación, significa todos los halógenos es decir flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) y yodo (I).

5 Como se usa en el presente documento, el término “heteroarilo” solo o en combinación se refiere a una estructura de anillo aromático monocíclico que contiene 5 ó 6 átomos de anillo, o a un grupo aromático bicíclico que tiene de 8 a 10 átomos, que contiene uno o más, preferentemente 1-4, más preferentemente 1-3, incluso más preferentemente 1-2, heteroátomos seleccionados de forma independiente del grupo O, S y N y opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos o sustituyentes de halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino  
10 opcionalmente mono o disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono o N,N-disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino o similares. Con heteroarilo también se pretende incluir S o N oxidado, tal como sulfonilo, sulfonilo y N-óxido de un nitrógeno de anillo terciario. Un átomo de carbono o de nitrógeno es el punto de unión de la estructura de anillo heteroarilo de modo que se retiene un anillo aromático estable. Ejemplos de grupos heteroarilo son ftalimida, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, quinazolinilo, purinilo, indolilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, tienilo, isoxazolilo, oxatiadiazolilo, isotiazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, triazinilo, furanilo, benzofurilo, indolilo y similares. Un heteroarilo sustituido contiene un sustituyente fijado a un carbono o nitrógeno disponible para producir un compuesto estable.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “heteroarilo sustituido” se refiere a un heterociclo opcionalmente mono o poli-sustituido con uno o más grupos funcionales, por ejemplo, halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

25 Como se usa en el presente documento, el término “heteroarilcarbonilamino” indica el grupo  $-NR^qC(O)R^f$ , en el que  $R^q$  es hidrógeno o alquilo inferior y  $R^f$  es arilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “heteroariloxi” indica el grupo -OHet, en el que Het es un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término “heteroarilsulfonilamino” indica el grupo  $-NR^qS(O)_2R^s$ , en el que  $R^q$  es hidrógeno o alquilo inferior y  $R^s$  es heteroarilo opcionalmente sustituido.

30 Como se usa en el presente documento, el término “heterociclo” se refiere a un grupo aromático saturado o insaturado que tiene un único anillo (p. ej., morfolino, piridilo o furilo) o múltiples anillos condensados (p. ej., naftiridilo, quinoxalilo, quinolinilo, indolicinilo o benzo[b]tienilo) y que tiene átomos de carbono y al menos un heteroátomo, tal como N, O o S, dentro del anillo, que opcionalmente puede estar insustituido o sustituido con, por ejemplo, halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

35 Como se usa en el presente documento, el término “heterociclo sustituido” es un heterociclo sustituido con 1 o más, por ejemplo 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados del grupo constituido por alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, arilo, arilo sustituido, ariloxi, heteroariloxi, amino, amido, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono o N,N-disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, acilo, carboxilo, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfonamido y oxi, unidos en cualquier punto disponible para producir un compuesto estable.

45 Como se usa en el presente documento, el término “hidrocarbilo” comprende un radical orgánico en el que el armazón del mismo comprende sólo carbono e hidrógeno. Por tanto, hidrocarbilo abarca alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, arilo, alquilarilo, arilalquilo, arilalqueno, alquilarilo, arilalquino, alquilarilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “hidrocarbilo sustituido” comprende cualquiera de los grupos hidrocarbilo a los que se ha hecho referencia anteriormente que además portan uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, amino, alquilamino, alquilamino sustituido, carboxi,  $-C(S)SR$ ,  $-C(O)SR$ ,  $-C(S)NR_2$ , en el que cada R es, de forma independiente, hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, nitro, ciano, halo,  $-SO_3M$  o  $-OSO_3M$ , en el que M es H, Na, K, Zn, Ca o meglumina, guanidinilo, guanidinilo sustituido, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, hidrocarbilarilo, hidrocarbilarilo sustituido, hidrocarbilariloxi, hidrocarbilariloxi sustituido, acilo, aciloxi, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilcarbonilo, heteroarilcarbonilo sustituido, carbamoilo, monoalquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, arilcarbamoilo,

un grupo carbamato, un grupo ditiocarbamato, aroílo, aroílo sustituido, organosulfonilo, organosulfonilo sustituido, organosulfonilo, alquilsulfonilo sustituido, alquilsulfonilamino, alquilsulfonilamino sustituido, arilsulfonilamino, arilsulfonilamino sustituido, un grupo sulfonamida, sulfurilo y similares, incluidos dos o más de los grupos descritos con anterioridad unidos a dicho resto hidrocarbilo mediante dichos restos ligador/espaciador como -O-, -S-, -NR-, en el que R es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, -C(O)-, -C(S)-, -C(=NR')-, -C(=CR'₂)-, en el que R' es alquilo o alquilo sustituido, -O-C(O)-, -O-C(O)-O-, -O-C(O)-NR- (o -NR-C(O)-O-), -NR-C(O)-, -NR-C(O)-NR-, -S-C(O)-, -S-C(O)-O-, -S-C(O)-NR-, -O-S(O)₂, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-NR-, -O-S(O)-, -O-S(O)-O-, -O-S(O)-NR-, -O-NR-C(O)-, -O-NR-C(O)-O-, -O-NR-C(O)-NR-, -NR-O-C(O)-, -NR-O-C(O)-O-, -NR-O-C(O)-NR-, -O-NR-C(S)-, -O-NR-C(S)-O-, -O-NRC(S)-NR-, -NR-O-C(S)-, -NR-O-C(S)-O-, -NR-O-C(S)-NR-, -O-C(S)-, -O-C(S)-O-, -O-C(S)-NR- (o -NR-C(S)-O-), -NR-C(S)-, -NR-C(S)-NR-, -S-S(O)₂, -S-S(O)₂-O-, -S-S(O)₂-NR-, -NR-O-S(O)-, -NR-O-S(O)-O-, -NR-O-S(O)-NR-, -NR-OS(O)₂, -NR-O-S(O)₂-O-, -NR-O-S(O)₂-NR-, -O-NR-S(O)-, -O-NR-S(O)-O-, -O-NR-S(O)-NR-, -O-NR-S(O)₂-O-, -O-NR-S(O)₂-, -O-P(O)R₂-, -S-P(O)R₂-, -NR-P(O)R₂-, en los que cada R es de forma independiente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido y similares.

5

10

15

Como se usa en el presente documento, "hidrocarbilo" se refiere a grupos -O-hidrocarbilo que contienen 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "hidrocarbilarcarbonilo" se refiere a grupos -C(O)-hidrocarbilo que contienen 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilarcarbonilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilarcarbonilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

20

Como se usa en el presente documento, "hidrocarbiloicarbonilo" se refiere a grupos -C(O)-O-hidrocarbilo que contienen 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbiloicarbonilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbiloicarbonilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

25

Como se usa en el presente documento, "hidrocarbilarcarbonilo" se refiere a grupos -O-C(O)-hidrocarbilo que contienen 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilarcarbonilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilarcarbonilo que además portan uno o más sustituyentes como se establece en el presente documento.

30

Como se usa en el presente documento, "hidrocarbilenilo" comprende cualquier radical divalente orgánico en el que el armazón del mismo comprende sólo carbono e hidrógeno. Por tanto, hidrocarbilenilo abarca alquilenilo, cicloalquilenilo, alquenilenilo, cicloalquenilenilo, alquinilenilo, arilenilo, alquilarilenilo, arilalquilenilo, arilalquenilenilo, alquenilarilenilo, arilalquinilenilo, alquinilarilenilo y similares, e "hidrocarbilenilo sustituido" se refiere a cualquiera de los grupos hidrocarbilenilo a los que se ha hecho referencia anteriormente que además portan uno o más sustituyentes tal como se ha establecido en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "hidroxilo" e "hidroxi" se refieren al grupo -OH.

35

Como se usa en el presente documento, el término "organosulfonilo" se refiere a sustituyentes que tienen la estructura -S(O)-organo, en la que organo abarca restos alquilo, alcoxi, alquilamino y arilo, así como restos alquilo, alcoxi, alquilamino y arilo sustituidos.

Como se usa en el presente documento, el término "organosulfonilo" se refiere a sustituyentes que tienen la estructura -S(O)₂-organo, en la que organo abarca restos alquilo, alcoxi y alquilamino, así como restos alquilo, alcoxi o alquilamino sustituidos.

40

Como se usa en el presente documento, el término "oxo" se refiere a un sustituyente oxígeno unido mediante un doble enlace al carbono.

Como se usa en el presente documento, el término "sulfonilo" indica el grupo -S(O)-.

45

Como se usa en el presente documento, la expresión "sulfonilo sustituido" indica el grupo -S(O)R<sup>t</sup>, en el que R<sup>t</sup> es alquilo inferior, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterociclilalquilo, heterociclilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "sulfonilo" indica el grupo -S(O)₂-.

50

Como se usa en el presente documento, la expresión "sulfonilo sustituido" indica el grupo -S(O)₂R<sup>t</sup>, en el que R<sup>t</sup> es alquilo inferior, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterociclilalquilo, heterociclilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "sulfonilamino" indica el grupo -NR<sup>q</sup>S(O)₂-, en el que R<sup>q</sup> es hidrógeno o alquilo inferior.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sulfonilamino sustituido" indica el grupo  $-NR^qS(O)_2R^u$ , en el que  $R^q$  es hidrógeno o alquilo inferior, y  $R^u$  es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "sulfurilo" se refiere a sustituyentes de la estructura  $=S(O)_2$ .

Como se usa en el presente documento con relación a valores numéricos, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" significan un 10% del valor indicado.

### **Breve descripción de las figuras**

10 La figura 1 es una representación esquemática de la modificación química (Q) que altera la extensión del cebador oligonucleotídico mediada por la ADN polimerasa antes de la activación de "inicio en caliente".

La figura 2 es una representación esquemáticas del mecanismo probable de la fragmentación intramolecular inducida térmicamente mediante la cual un enlace fosfotriéster se convierte en un enlace fosfodiéster no modificado en estado activo en el extremo 3' que puede extender la polimerasa.

15 La figura 2 es un esquema sintético general para modificar los cebadores oligonucleotídicos con derivados fosforoamidita.

### **Descripción detallada de la invención**

20 Una reacción de amplificación de ácido nucleico tal como la PCR implica hibridación de un cebador oligonucleotídico con un ácido nucleico diana mediante la cual una polimerasa incorpora desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) para formar múltiples copias de una secuencia diana. No obstante, la reacción de amplificación a menudo da productos no deseados debido a un cebado incorrecto y a la formación de dímeros de cebadores que afectan a la eficiencia y precisión del procedimiento. Muchos productos no deseados se producen durante la temperatura inicial aumentan la reacción de amplificación.

25 La presente invención proporciona procedimientos mejorados para amplificar ácidos nucleicos. En aspectos concretos, la invención está dirigida al uso de cebadores oligonucleotídicos para amplificación e las reacciones de amplificación dependientes de la temperatura. En ciertos aspectos, los cebadores oligonucleotídicos para amplificación pueden emplear un grupo de modificación termoextraíbles preferentemente en el extremo 3' que altera la formación de productos de amplificación no deseados.

30 Algunas estrategias se basan en el uso de cebadores oligonucleotídicos modificados químicamente. Will, y col., (patente de EE.UU. nº 6.001,611) describe el uso de modificaciones de bases en el cebador para minimizar la formación de dímeros de cebadores y el cebado incorrecto. Ankenbauer, y col. (solicitud de patente de EE.UU. nº 20030119150, también publicada como EP1275735 y JP2003038180) describen un cebador oligonucleotídico bloqueado en el extremo 3' con un grupo fosfato que se elimina mediante una 3'-5' exonucleasa termoestable. Ullman, y col. (patente de EE.UU. nº 6.482.590) divulgan un cebador oligonucleotídico que está modificado en el extremo 3' que también se elimina mediante una exonucleasa. Bonner, y col. (solicitud de la patente de EE.UU. nº 20030162199) reivindica un cebador oligonucleotídico modificado con glioxilo en el nucleótido guanósina que es un enlace covalente termoreversible que rompe la hibridación con una hebra diana.

40 Se han usado grupos termolábiles y se han descrito en la literatura para usar en el proceso de síntesis de cebadores oligonucleotídicos. Véase Grajkowski, y col., 3 Org. Lett., 1287-90 (2001); Wilk, A., y col., 42 Tetrahedron Lett., 5635-39 (2001); Wilk, A., y col., 67 J. Org. Chem., 6430-38 (2002); Cieslak, J., y col., 68 J. Org. Chem., 10123-29 (2003); Cieslak, J., y col., 69 J. Org. Chem., 2509-15 (2004); y Beaucage y col., patente de EE.UU. nº 6.762,298.

45 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, en el que el procedimiento incluye amplificar ácido nucleico usando un cebador oligonucleotídico modificado, en el que el cebador oligonucleotídico modificado incluye uno o más grupos de modificación en el extremo 3'. El grupo de modificación se disocia durante la etapa de desnaturalización inicial de la amplificación. En una forma de realización, el grupo de modificación incluye uno o más de los siguientes grupos químicos de fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, Fórmula Ic, Fórmula Id, Fórmula II, Fórmula III y/o Fórmula IV como se describe más adelante en el presente documento.

50 En el presente documento también se divulga un cebador oligonucleotídico modificado que es un cebador oligonucleotídico que posee al menos un nucleótido con un grupo de modificación en el extremo 3' del mismo en comparación con un cebador oligonucleotídico que tiene un nucleótido no modificado o en estado activo en el extremo 3'. Para el fin de definir la posición de un nucleótido modificado, el extremo 3' incluye cualquiera de los últimos seis nucleótidos del extremo 3' del cebador oligonucleotídico, preferentemente cualquiera de los tres últimos nucleótidos. Un nucleótido modificado no puede extender la cadena, es decir no es extensible, a lo largo de un polinucleótido al que

está hibridado bien a través de la inhibición de la enzima o a través de la disminución de la hibridación al ácido nucleico diana. De acuerdo con esto, no se produce ningún grado sustancial de extensión de la cadena a menos, y hasta que, se elimine la modificación o el nucleótido modificado. La modificación altera la extensión del cebador oligonucleotídico mediada por la ADN polimerasa antes del periodo de incubación inicial a una temperatura elevada de amplificación, como en la PCR. Los cebadores oligonucleotídicos tal como se divulgan en el presente documento tienen dos estados. Primero, la población del cebador oligonucleotídico está en un estado inactivo hasta que se alcanza la temperatura de desnaturalización inicial, a menudo 95°C, pero puede ser entre 80 y 105°C, más preferentemente entre aproximadamente 85 y 100°C, más preferentemente entre 90 y 96°C. Después de alcanzar la temperatura de desnaturalización inicial, el cebador oligonucleotídico se convierte en activo mediante fragmentación intramolecular inducida térmicamente que convierte un cebador oligonucleotídico modificado en el correspondiente cebador oligonucleotídico no modificado. Este segundo estado del cebador oligonucleotídico tiene un enlace fosfodiéster en estado activo y se puede extender con la acción de la polimerasa. La disociación parcial o completa del grupo de modificación se produce, preferentemente, tras incubación a aproximadamente 95°C con t<sub>1/2</sub> entre aproximadamente 0,1-1,20 minutos, pero puede producirse entre aproximadamente 1-120 minutos, 2-90 minutos, preferentemente entre aproximadamente 2-60 minutos, preferentemente entre aproximadamente 2-40 minutos, preferentemente entre aproximadamente 2-30 minutos, preferentemente entre aproximadamente 2-5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 4 minutos, más preferentemente entre aproximadamente 3 minutos, e incluso más preferentemente en aproximadamente 2 minutos. En ciertas formas de realización, la disociación se produce con respecto a la temperatura y no requiere enzimas, agentes químicos o condiciones de reacción de amplificación, como el pH.

Los cebadores oligonucleotídicos modificados tal como se divulgan en el presente documento tienen dos estados. El primer estado del cebador oligonucleotídico modificado está en estado inactivo debido a la presencia de un grupo de modificación hasta que se alcanza la temperatura de desnaturalización inicial, preferentemente 80°C o, preferentemente, 85°C, o, preferentemente, 90°C o, preferentemente, 95°C. Después de alcanzar la temperatura de desnaturalización inicial, el cebador oligonucleotídico se activa mediante fragmentación intramolecular inducida térmicamente que convierte el oligonucleótido al segundo estado. Este segundo estado del cebador oligonucleotídico es el correspondiente cebador oligonucleotídico no modificado que tiene un enlace fosfodiéster en estado activo y se puede extender con la acción de la polimerasa. La disociación del grupo de modificación se produce, preferentemente, a aproximadamente 95°C entre aproximadamente 0,1-120 minutos, o entre aproximadamente 1-120 minutos, o entre aproximadamente 2-90 minutos o entre aproximadamente 2-60 minutos o entre aproximadamente 2-40 minutos o entre aproximadamente 2-30 minutos, 2-10 minutos o entre aproximadamente 2-8 minutos o entre aproximadamente 2-5 minutos; o 2 minutos o 5 minutos o 10 minutos. En ciertas formas de realización, la disociación se produce con respecto a la temperatura y no requiere enzimas, agentes químicos o condiciones de reacción de amplificación, como el pH. En otra forma de realización, el grupo de modificación no se disocia de un oligonucleótido modificado por debajo de aproximadamente 80°C o por debajo de aproximadamente 85°C o por debajo de aproximadamente 90°C.

También se divulga en el presente documento un cebador oligonucleotídico para amplificación de ácido nucleico en el que la secuencia de ácido nucleico tiene uno o más grupos de modificación. Preferentemente, el grupo de modificación incluye uno o más de los siguientes grupos químicos de fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, Fórmula Ic, Fórmula Id, Fórmula II, Fórmula III y/o Fórmula IV. En una forma de realización preferida, el oligonucleótido modificado tiene entre aproximadamente 6-70 nucleótidos de longitud, preferentemente 10-45 nucleótidos de longitud, preferentemente entre 15-30, más preferentemente entre 19-29.

El cebador oligonucleotídico modificado tiene al menos un enlace internucleotídicos modificado. En otra forma de realización, el cebador oligonucleotídico puede comprender una secuencia contigua de 2, 3, 4, 5 ó 6 enlaces internucleotídicos modificados que terminan en el extremo 3' del cebador oligonucleotídico. En otra forma de realización, el cebador oligonucleotídico puede comprender múltiples enlaces internucleotídicos modificados en 3' no contiguos. El extremo 5' del cebador oligonucleotídico modificado puede también tener una secuencia de nucleótidos, incluidos enlaces internucleotídicos modificados. En otra forma de realización, todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido pueden estar modificados.

En otra forma de realización preferida, el cebador oligonucleotídico modificado comprende un grupo de modificación en el enlace internucleotídico 3' n del cebador oligonucleotídico en el que n es el enlace internucleotídico en el extremo 3'. En otras formas de realización más, el grupo de modificación está en el enlace internucleotídico 3' n-1, n-2, n-3 o n-4 del oligonucleótido. En otra forma de realización más, el oligonucleótido tiene grupos de modificación en más de una de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6; preferentemente dos o más de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6; preferentemente tres o más de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6; preferentemente cuatro o más de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6; preferentemente cinco o más de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6 o preferentemente seis o más de las posiciones n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6.

El grupo de modificación se puede integrar en un oligonucleótido usando los procedimientos síntesis automática y purificación existentes. Los cebadores oligonucleotídicos tal como se divulgan en el presente documento se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, incluida la síntesis química automática en fase sólida usando precursores de cianoetilfosforoamidita (Barone y col., 12 Nucleic Acids Research, 4051 (1984)), y como

se describe en J. Sambrook, E. F. Fritsch y Maniatis, T., *Molecular Cloning*, ch. 11 (2ª ed. 1989). Otros enfoques incluyen procedimientos de síntesis de fosfotriéster y fosfodiéster que se pueden usar (Narang, y col., *Meth. Enzymol.* 68-90 (1979)). Una revisión exhaustiva de diversos procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos modificados y no modificados se puede encontrar en Beaucage, S.L. y col., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (2006). Tras la síntesis y purificación de un cebador oligonucleotídico modificado se pueden usar varios procedimientos diferentes para determinar la aceptabilidad del cebador oligonucleotídico en términos de tamaño y pureza. Uno de estos procedimientos es la electroforesis en gel de poliacrilamida. Otro de estos procedimientos es la cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC"). Estos procedimientos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los procedimientos actuales empelados para la purificación y la separación en la técnica se pueden aplicar también a los cebadores oligonucleotídicos modificados. Se puede usar cualquier grupo de modificación que consiga los propósitos de la presente invención. El grupo de modificación deberá ser uno que se disocie o se pueda eliminar en las condiciones de la reacción de amplificación en la que se usa el cebador oligonucleotídico modificado. Por otro lado, la modificación no debe disociarse tan rápido que no se pueda obtener el control de la disociación necesario para alcanzar los beneficios de la presente invención. El tipo y la extensión de la modificación del extremo 3' del cebador oligonucleotídico modifica se determina, en general, empíricamente con el objetivo de alcanzar los parámetros anteriores para el control de la disociación del extremo 3' del cebador oligonucleotídico modificado.

Aunque se entiende que no todos los cebadores oligonucleotídicos en la reacción de amplificación estarán inicialmente en el estado inactivo, preferentemente la mezcla de estados del cebador oligonucleotídico mejora la especificidad en una población mixta en comparación con no usar ningún oligonucleótido modificado. Preferentemente, los oligonucleótidos modificados comprenden al menos un 30% de los oligonucleótidos totales, preferentemente al menos un 70% de los oligonucleótidos totales, preferentemente al menos un 80% de los oligonucleótidos totales y, más preferentemente, al menos un 90% de los oligonucleótidos totales. En otra forma de realización, sólo los oligonucleótidos directos o sólo los inversos pueden ser oligonucleótidos modificados. En las reacciones con sólo una orientación de oligonucleótidos modificados, tal como oligonucleótidos directos, los oligonucleótidos modificados comprenden al menos un 50% de los oligonucleótidos directos totales o al menos un 60% de los oligonucleótidos directos totales o al menos un 70% de los oligonucleótidos directos totales o al menos un 80% de los oligonucleótidos directos totales o al menos aproximadamente un 90% de los nucleótidos directos totales.

También se divulga en el presente documento una fosforoamidita químicamente modificada con un grupo de modificación que se puede extraer con calor cuando se forma el oligonucleótido correspondiente. Cada fosforoamidita se puede modificar con un grupo termolábil que a su vez se puede usar en la síntesis de cebadores oligonucleotídicos que sea compatible con los procedimientos de síntesis actuales. La fosforoamidita modificada se puede añadir a cualquier posición del cebador oligonucleotídico. En contraste con ello, la modificación de glioxilo sólo se puede añadir a guanina (dG). Por tanto, la localización de la modificación depende de la secuencia del cebador oligonucleotídico. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden tener grupos de modificación añadidos específicamente en cualquier posición o posiciones deseadas.

También se divulga un cebador que contiene análogos nucleosídicos, tal como se describe en el presente documento.

La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), una polimerasa termoestable, así como otras ADN polimerasas no extienden fácilmente los cebadores oligonucleotídicos que tienen uno o más enlaces internucleotídicos modificados con metilfosfonato en su extremo 3'. Sauer, y col. 30 *Nucleic Acids Res.*, e22 (2002). Aunque no cabe predecir que los enlaces internucleotídicos de metilfosfonato (Figura 1) sufrieran conversión térmicamente inducida en un enlace fosfodiéster en estado activo en medios acuosos neutros, se puede diseñar una modificación alternativa como en la presente invención para hacerlo en caso a factores estéricos y electrónicos.

También se divulga en el documento un cebador oligonucleotídico químicamente modificado con un grupo protector extraíble por calor en temperaturas compatibles con procedimientos de amplificación actualmente en uso. El grupo de modificación puede alterar el apareamiento de bases con una secuencia diana o inhibe la extensión por la polimerasa. La polimerasa no puede extender el cebador oligonucleotídico hasta que la reacción de amplificación alcanza una temperatura óptima que coincide con la etapa de desnaturalización inicial de la PCR y disminuye significativamente los productos de amplificación no deseados.

Además de ser estable a temperatura ambiente, el grupo de modificación es estable en las condiciones para la síntesis de cebadores oligonucleotídicos, procedimientos de separación tales como cromatografía, procedimientos de purificación tales como precipitación en alcohol, almacenamiento prolongado y preparación de la reacción de amplificación. Preferentemente, los oligonucleótidos modificados se almacenan en forma de un sólido o en solución de DMSO a -80°C, -20°C, 4°C o a temperatura ambiente.

En otra forma de realización, los cebadores oligonucleotídicos con el grupo de modificación son sustancialmente quiralmente puros (Rp o Sp). Stec, y col., 26 *Tetrahedron Lett.*, 2191-2194 (1985), Gallo, y col., 14 *Nucleic Acids Res.*, 7405-7420 (1986), Koziolkiewicz, y col., 26 *Chem. Scripta*, 251-60 (1986) y LaPlanche, y col., 14 *Nucleic Acids Res.*, 9081-93 (1986) han descrito técnicas de separación.

En otra forma de realización, los cebadores oligonucleotídicos con o sin el grupo de modificación son complementarios al ácido nucleico diana de interés. Preferentemente, el cebador oligonucleotídico es al menos 75%, al menos 85%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, y, más preferentemente, al menos 98% complementario del ácido nucleico diana.

5 También se divulgan kits que contienen un cebador oligonucleotídico modificado. Por ejemplo kits que contienen reactivos de PCR, así como cebadores oligonucleotídicos modificados para las dianas de amplificación habituales tales como genes domésticos. El kit puede comprender uno o más reactivos de amplificación de ácido nucleico seleccionados del grupo que consiste en tampón de reacción, dNTP, magnesio, polimerasa y cebadores oligonucleotídicos modificados. Preferentemente, el kit comprende dos o más reactivos de amplificación de ácido nucleico, preferentemente tres o más  
10 y más preferentemente cuatro o más.

También se divulgan reactivos de fosforoamidita modificados para la síntesis de cebadores en fase sólida. Estos reactivos se venderán individualmente o en equipos. Estos reactivos pueden incluir las fosforoamiditas de los cuatro desoxinucleótidos naturales (dA, dC, dG, and dT) modificados con uno del(los) grupo(s) de modificación descrito(s). Los reactivos pueden también incluir fosforoamiditas de análogos nucleosídicos tal como se ha definido en el presente documento.  
15

También se divulgan reactivos de soporte sólido para usar en la síntesis de cebadores en fase sólida. Estos soportes sólidos contendrán al menos dos nucleótidos unidos, con grupos de modificación internucleótidos de fórmula I, Ia, Ib, Ic, Id, II, III o IV o en todas las posibles posiciones a lo largo del oligonucleotídico.

La invención se describirá a continuación con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

## 20 **Ejemplo 1**

### **Síntesis de nucleósidos fosforoamiditas**

Una primera etapa de sintetizar una fosforoamidita nucleósido es hacer reaccionar la bis(diisopropilamino)clorofosfina con el alcohol precursor del grupo de modificación deseado. El producto monoesterificado resultante se hace reaccionar con el nucleósido adecuadamente protegido en presencia de diisopropilamonio tetrazolida como catalizador para generar el nucleósido fosforoamidita nucleósido. Aunque los alcoholes N-(2-hidroxiemil)ftalamida, 4-oxo-1-pentanol y 4-metil-1-butanol están comercialmente disponibles, se puede preparar 3-(N-terc-butylcarboxamido)-1-propanol de acuerdo con el procedimiento publicado por Wilk, A., y col., 67 J. Org. Chem., 6430-38 (2002)  
25

Previendo la baja estabilidad del fragmento de fosfotriéster en los cebadores oligonucleotídicos sintetizados, las bases nucleosídicas se protegieron con un grupo protector ultradébil o tradicional, en los que el grupo protector de bases ultradébil incluía fenoxiacetilo para adenina y citosina, e isopropil-fenoxiacetilo para guanina.  
30

Tras la producción de fosforoamiditas modificadas para 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxicitosina, 2'-desoxiguanosina y 2'-desoxitimidina, se sintetizaron las secuencias tetranucleotídicas modelo que contenían un único grupo PTE 3'-internucleótido. El acoplamiento entre la fosforoamidita modificada y un 5'-OH nucleósido unido a un soporte de CPG puede realizarse manualmente o mediante una máquina para síntesis automática. En este caso se usó 8909 Expedite Synthesizer de acuerdo con los protocolos sugeridos por el fabricante.  
35

Los derivados tetranucleotídico 3-fosfotriéster se desprotegeron y escindieron del soporte de CPG mediante tratamiento con carbonato potásico 50 mM en metanol durante varias horas. Se usó purificación HPLC de fase inversa (con el gradiente de acetonitrilo en tampón de acetato de trietilamonio (pH 7,2)) para el aislamiento de los 3'-fosfotriéster tetranucleotídicos que contienen grupos 4-metil-1-butanol (MTB), 4-oxo-1-pentanol (OXP) y 3-(N-terc-butylcarboxamido)-1-propanol (TBCA). En la mayoría de los casos, las condiciones usadas durante la síntesis, desprotección y escisión del soporte tuvieron como resultado una pérdida parcial de la función de PTE (para el grupo N-(2-hidroxiemil)ftalimido PTE, EPH, durante estas etapas se produjo la desprotección completa). Con optimización adicional, el grado de degradación de la funcionalidad PTE puede disminuir significativamente. Se demostró que cada uno de los 3'-fosfotriéster tetranucleotídicos era estable durante varios meses cuando se mantuvieron en solución congelada a -70°C. Además de las secuencias de los tetranucleotídicos también se prepararon secuencias de oligonucleotídicos protegidos con PTE más largas adecuadas para PCR. En la Tabla 1 siguiente se proporcionan Ejemplos.  
40  
45

**Tabla 1: Desoxioligonucleotídicos sintetizados**

Secuencia (5' a 3')	Grupo PTE	Descripción
GCAT (SEQ ID NO:1)	TBCA	modelo
GCAT (SEQ ID NO:2)	MTB	Modelo

GACT (SEQ 10 NO:3)	TBCA	modelo
GCAT (SEQ 10 NO:4)	OXP	Modelo
GACP <sup>a</sup> (SEC ID N° 5)	EPH	modelo
GAA TTG GGT GTC AAC ATA GCA GAA T (SEC ID N° 6)	OXP	Cebador 1 de VIHb
GAA TTG GGT GTC AAC ATA GCA GAA T (SEC ID N° 7)	Ninguno	Cebador 1 de VIH
AAT ACT ATG GTC CAC ACA ACT ATI GCT (SEC ID N° 8)	OXP	Cebador 2 de VIH
AAT ACT ATG GTC CAC ACA ACT ATT GCT (SEC ID N° 9)	nNINGUNO	Cebador 2 de VIH
AAG GAG CTG GCT GAC ATT TTC G (SEC ID N° 10)	OXP	Cebador 1 de ADN <sup>c</sup> Lambda
AAG GAG CTG GCT GAC ATT TTC G (SEC ID N° 11)	Ninguno	Cebador 1 de ADN Lambda
CGG GAT ATC GAC ATT TCT GCA CC (SEC ID N° 12)	OXP	Cebador 2 de ADN Lambda
CGG GAT ATC GAC ATT TCT GCA CC (SEC ID N° 13)	Ninguno	Cebador 2 de ADN Lambda
<b>TAA TGC CTA TTC TGC TAT GTT GGC ACC</b> <b>CAA TTC TTT TTT T (SEC ID N° 14)</b>	Ninguno	Molde 1 del VIH
<b>AAT CTT AGC AAT AGT TGT GTG GAC CAT AGT ATT</b> <b>TTT TTT T (SEC ID N° 15)</b>	Ninguno	Molde 2 del VIH
<sup>a</sup> pérdida completa del grupo PTE se produjo durante la desprotección		
<sup>b</sup> diana de VIH: Kit de reactivos control Gen Amplimer HOV-1		
<sup>c</sup> diana de ADN lambda: Clon 857 Sam 7 (Roche)		

## Ejemplo 2

### **Conversión cinética de un oligonucleótido modificado con PTE en la correspondiente secuencia de PDE**

5 Se investigó la cinética de la desprotección de las secuencias de tetranucleótidos modificadas con 3'-fosfotriéster (PTE) con la correspondiente secuencia de fosfodiéster (PDE) a Ph "neutro" (en mezcla de acetoniTrilo acetato de trietilamonio, pH 7,2) o en tampón de PCR (Ph 8,4 a 25°C) a 20°C, 50°C y 95°C. En ambos tampones fueron obvias cinéticas de desprotección similares para los cebadores oligonucleotídicos que contienen PTE.

10 El  $t_{1/2}$  para la conversión del cebador oligonucleótido modificado con PTE en la correspondiente secuencia de PDE se determinó que variaba de > 1 minuto a 10 minutos a 95°C para los derivados de tetranucleótido 3'-fosfotriéster OXP, MTB y TBCA. A una temperatura menor (50°C), las cinéticas de desprotección fueron menores, variando el  $t_{1/2}$  de 10 a 105 minutos. A temperatura ambiente (20°C), el  $t_{1/2}$  fue entre 3 y > 100 horas. Para la aplicación adecuada en tecnologías de PCR de inicio en caliente, los grupos PTE deberán ser óptimamente estables durante las condiciones de síntesis y desprotección (20°C) y se pueden eliminar fácilmente a temperaturas elevadas (95°).

## Ejemplo 3

### 15 **Síntesis a gran escala de fosforoamiditas**

20 Para la síntesis y preparación a mayor escala de cantidades en múltiples gramos (escala a partir de 5 g) de las fosforoamiditas protegidas en 3' de dA, dG, dC y dT usando el procedimiento en recipiente de dos etapas que se muestra en la Figura 3. Como antes se usaron grupos protectores ultradébiles para aminoácidos exocíclicos de las bases nucleosídicas. Las fosforoamiditas 3' nucleósido protegidas en 5'-DMT se aislaron mediante cromatografía en gel de sílice con un rendimiento global de 50-70% y se demostró que un sólido era estable a temperatura ambiente durante al menos dos semanas. Se ha previsto que la nucleósido 3'-fosforoamidita debería ser estable para su almacenamiento a baja temperatura (entre aproximadamente -70°C a -100°C) durante al menos un año.

**Ejemplo 4****Comparación de la extensión por ADN polimerasa de PTE y PDE**

Para las dianas de ADN de VIH-1 (Q. Chou y col.) y Lambda se preparó una serie de cebadores oligonucleótidos directos e inversos, que contenían modificaciones PTE. Para cada diana, un conjunto contenía un grupo fosfotriéster en el enlace 3'-internucleotídico y el otro conjunto contenía el enlace fosfodiéster en estado activo en la posición correspondiente. Estos cebadores oligonucleotídicos se escogieron porque se demostró que los cebadores oligonucleotídicos de PDE no modificados formaban dímeros de cebadores durante la PCR. El primer acoplamiento entre la fosforoamidita modificada y el 5'-OH nucleósido unido a un soporte sólido-CPG se realizó manualmente, mientras que el resto de la síntesis se realizó en 8909 Expedite Synthesizer usando los protocolos sugeridos por el fabricante (a escala de 1  $\mu$ mol). Los cebadores oligonucleotídicos se desprotegieron y escindieron del soporte polimérico usando carbonato potásico 50 mM en metanol. La purificación en HPLC de fase inversa (con un gradiente de acetonitrilo en tampón de acetato de trietilamonio (Ph 7,2)) permitió el éxito de la purificación y el aislamiento de los cebadores oligonucleotídicos modificados con 3'-fosfotriéster. Se demostró que los cebadores oligonucleotídicos con PTE aislados eran estables durante varios meses cuando se mantienen en una solución congelada a -20°C.

Los cebadores de PDE y PTE aislados se hibridaron con moldes complementarios y se sometieron a experimentos de extensión con ADN polimerasa. Como control en estos experimentos se calentaron alícuotas de los cebadores de PDE y PTE a 95°C durante la cantidad de tiempo necesaria para la eliminación del grupo PTE y se incluyeron en los experimentos de extensión del cebador. Los experimentos de extensión del cebador se realizaron a temperatura ambiente tanto para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I como para la *Taq* ADN polimerasa, para evitar la pérdida extensa de la funcionalidad PTE. Para monitorizar la cinética de la extensión del cebador se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo especificados durante un periodo de 2 a 80 minutos y se inactivaron en hielo seco mediante la adición de EDTA. El progreso de la extensión se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante. Es interesante que se ha descubierto que los cebadores modificados con PTE no calentados migraban más lentamente durante la electroforesis en gel que los correspondientes cebadores oligonucleotídicos de PDE (calentados o no) (y que los cebadores oligonucleotídicos con PTE calentados).

Se investigaron las capacidades de la ADN polimerasa *Taq* y del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I para realizar la elongación dependiente de molde del cebador oligonucleotídico modificado con 3<sub>i</sub>-PTE (y los cebadores oligonucleotídicos control no modificados con PDE). En las condiciones de la reacción de amplificación se encontró que se puede alargar un cebador estándar con PDE hasta obtener un producto de extensión de longitud completa mientras que los cebadores oligonucleotídicos con PTE se extienden muy mal con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. Durante el marco de tiempo de las reacciones de extensión del cebador se produjo una ligera acumulación de productos de extensión truncados para las reacciones que contienen el cebador oligonucleotídico con PTE, algo que puede atribuirse a una desprotección parcial del cebador oligonucleotídico con PTE durante la reacción de extensión o a la extensión preferente de un estereoisómero de PTE. Cuando los cebadores oligonucleotídicos con PDE y PTE se calentaron previamente a 95°C, la extensión del cebador oligonucleotídico ya no está obstaculizada y es consistente con un cebador oligonucleotídico con PDE. Aunque los experimentos de extensión más detallados se realizaron con el fragmento Klenow mesofílico de la ADN polimerasa I, se obtuvieron resultados similares con la ADN polimerasa *Taq*, una ADN polimerasa adecuada para PCR. En general, la capacidad de extensión de los cebadores oligonucleotídicos que contienen PTE se redujo significativamente con respecto al correspondiente cebador oligonucleotídico con PDE en estado activo, un criterio esencial para un cebador oligonucleotídico para PCR "de inicio en caliente" de la presente invención.

**Ejemplo 5****Rendimiento de los cebadores oligonucleotídicos con PTE en PCR independiente de molde**

Debido a la mala capacidad de extensión del cebador oligonucleotídico con PTE en los experimentos de extensión de cebadores oligonucleotídicos (Ejemplo 4), se concluyó que los cebadores oligonucleotídicos con PTE deberían disminuir considerablemente la cantidad de dímero de cebador formado durante la preparación de muestras y la etapa de calentamiento inicial de la PCR restringiendo la capacidad de extensión de la ADN polimerasa. Para explorar adicionalmente el efecto del grupo modificado con PTE sobre la formación de dímero del cebador, se evaluaron las condiciones de PCR que generan dímeros de cebador con rendimientos altos en ausencia del molde. Por tanto, los cebadores oligonucleotídicos modificados con PTE dirigidos al gen tat del VIH-1 se calentaron previamente a 95°C en tampón de PCR (pH 8,4 a 25°C) para incrementar las cantidades de tiempo antes de la amplificación por PCR mediante la ADN polimerasa *Taq*. Mediante precalentamiento de los cebadores con PTE para cantidades crecientes de tiempo se puede evaluar el efecto de la modificación con PTE sobre la formación de dímeros del cebador. Los dímeros de cebador, que se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se observaron en forma de un fragmento de 50-80 pares de bases.

Para el par de cebadores oligonucleotídicos del VIH-1, la concentración del cebador oligonucleotídico para la formación



de dímeros de cebador fue de 4,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 5 veces mayor de lo que generalmente se recomienda y los parámetros para el ciclado de la PCR incluyeron: 95°C para 2 minutos; 30 ciclos de [95°C durante 40 segundos; 56°C durante 30 segundos; 72°C durante 2 minutos]; 72°C durante 7 minutos. Durante el tratamiento de calentamiento previo a la PCR de los correspondientes cebadores oligonucleotídicos con PTE antes de fijar la PCR, la cantidad de cebador oligonucleotídico con PDE generada debería ser proporcional al tiempo de precalentamiento de los cebadores oligonucleotídicos con PTE. Los inventores han descubierto que a medida que la fracción de cebadores oligonucleotídicos con PDE formada aumentaba, también lo hace la probabilidad de formar dímeros de cebadores durante la PCR. Para tiempos de pre-incubación hasta 0-40 minutos, la cantidad de dímero de cebador formada es proporcional al tiempo de calentamiento pre-PCR y la proporción se correlaciona de forma positiva con la cinética de la conversión del cebador oligonucleotídico con PTE en el cebador oligonucleotídico con PDE a 95°C. No obstante, cuando los cebadores oligonucleotídicos con PTE sufren un extenso tratamiento de precalentamiento (80 y 150 minutos), la cantidad de formación de dímero de cebador disminuye, una posible consecuencia de la degradación de los cebadores oligonucleotídicos mediante despurinación. En general, el nivel de formación de dímero de cebador oligonucleotídico en la PCR disminuyó significativamente mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos con PTE.

## 15 **Ejemplo 6**

### **Rendimiento de los cebadores oligonucleotídicos con PTE en PCR**

Para el cebador de ADN de lambda y del ADN del VIH-1, se identificaron las condiciones de PCR que formaban de forma eficiente dímeros de cebadores con los cebadores oligonucleotídicos con PDE no modificados en presencia de un molde. Usando los cebadores oligonucleotídicos dirigidos a los moldes de ADN del VIH y de lambda, las condiciones óptimas para la formación eficiente de dímeros de cebadores en presencia de molde emplearon una concentración de 1-2  $\mu\text{M}$  de los cebadores oligonucleotídicos tanto directo como inverso, 5-40.000 copias del molde y  $\text{MgCl}_2$  1,5 a 2,0 mM. Los parámetros del ciclo de PCR se usaron del siguiente modo: 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de [95°C durante 40 segundos; 56°C durante 30 segundos; 72°C durante 2 minutos]; 72°C durante 7 minutos. El progreso de la reacción se monitorizó eliminando los alícuotas después de los ciclos 30, 35 y 40, y analizándolos mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para las dianas de ADN de lambda y del VIH-1, se descubrió que los cebadores oligonucleotídicos modificados con PTE no calentados (PTE 0°C) mejoraban considerablemente el resultado de la PCR en comparación con los cebadores oligonucleotídicos con PDE no modificados sin calentar (PDE 0°C). En cada caso, los cebadores oligonucleotídicos con PTE sin calentar mostraron una considerable disminución de la cantidad de formación de dímero de cebador y un correspondiente incremento en la formación de amplicones.

Para asegurar que los mejores resultados de los cebadores oligonucleotídicos con PTE en la PCR no se debían a ninguna diferencia en la preparación y manipulación de los cebadores oligonucleotídicos con PDE y PTE, los cebadores oligonucleotídicos con PTE se calentaron previamente en tampón de PCR para la conversión en el correspondiente cebador oligonucleotídico con PDE. Posteriormente, los cebadores oligonucleotídicos con PTE calentados (PTE 95°C) y los cebadores oligonucleotídicos con PDE calentados (PDE 95°C) se emplearon en la PCR y se descubrió que se formaban dímeros de cebador hasta un grado similar, si no mayor, que los cebadores oligonucleotídicos con PDE. La integración de las bandas de amplicón y de los dímeros de cebador para el sistema de ADN de lambda y del VIH (para el ciclo 35) revelaron una proporción mucho mayor entre el amplicón y el dímero de cebador para los cebadores oligonucleotídicos con PTE en comparación con las amplificaciones con PCR que se realizaron con cebadores oligonucleotídicos con PDE o con cebadores oligonucleotídicos con PTE calentados. Cuando la proporción entre el amplicón y el dímero de cebadores para todas las reacciones de amplificación se normalizó con respecto a la proporción para el cebador oligonucleotídico con PTE sin calentar se observó una marcada mejora en la especificidad de la PCR para la formación de amplicones tanto para el sistema del ADN de lambda como para el de ADN del VIH-1. El cebador oligonucleotídico con PTE produjo una mejora de entre 2,6 y 15 veces en el rendimiento de la PCR. En general, se ha demostrado la utilidad de los cebadores oligonucleotídicos con PTE en la PCR de inicio en caliente de la presente invención en comparación con los cebadores oligonucleotídicos con PDE. La cantidad de dímero de cebadores disminuyó significativamente con un incremento concurrente de la producción de amplicones.

## 30 **Ejemplo 7**

### **Rendimiento de los cebadores oligonucleotídicos con PTE en PCR con transcriptasa inversa**

Se prepararon cebadores modificados con PTE para un sistema de RT-PCR de dos etapas usado para la detección del gen doméstico de la porfobilinógeno desaminasa (PBGD) tal como describen Kielar, D., y col., 47 Clinical Chemistry 2089-2097 (2001). Se fabricaron cebadores directos de SEC ID N° 16 (5'-GAGTGATTCGCGTGGGTACC) y cebadores inversos de SEC ID N° 17 (5'-GGCTC-CGATGGTGAAGCC) que contienen dos modificaciones con PTE por cebador en las dos posiciones terminales en 3'. Se usó detección de un producto amplicón de 264 pb para validar un sistema de protocolo de dos etapas.

El protocolo de dos etapas incluye transcripción inversa, seguida por amplificación por PCR. Condiciones de la transcripción inversa utilizadas fueron cebador oligo(dT) 0,4  $\mu$ M, 0 o 1  $\mu$ g de ARN total de hígado humano y 15 U de transcriptasa inversa AMV clonada en una reacción de 20  $\mu$ l. La reacción se sometió al siguiente protocolo de ciclado térmico con transcriptasa inversa: 25°C durante 10 minutos; 42°C durante 60 minutos; y 95°C durante 5 minutos. Tras la finalización, el producto de la transcripción inversa se diluyó a 1 en 10 y se usó como molde para una serie de reacciones de PCR. Se prepararon dos conjuntos de reacciones de PCR. El primer conjunto contenía cebadores de PDE no modificados a 0,5  $\mu$ M y el segundo conjunto contenía cebadores modificados con PTE a 0,5  $\mu$ M. Cada conjunto de reacciones contenía tres reacciones, cada una de las cuales utilizaba moldes diferentes: Reacción a) agua, reacción b) 0  $\mu$ g del producto de transcripción inversa del ARN total de hígado humano y reacción c) 1  $\mu$ g del producto de transcripción inversa del ARN total de hígado humano. Todas las reacciones de PCR contenían 1,25 U de ADN polimerasa Taq y tenían un volumen de 50  $\mu$ l. Las mezclas se sometieron al protocolo de ciclado térmico: 94°C durante 10 minutos; [94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos] 40 veces. Los productos de reacción se analizaron después mediante análisis en gel de agarosa. Las reacciones a) y b) de ambos conjuntos funcionaron como controles negativos. Para los controles negativos, los cebadores con PDE no modificados formaron una cantidad significativa del dímero de cebadores, mientras que los cebadores con PTE modificados no mostraron ninguna formación detectable de dímero de cebadores. Para los cebadores con PDE y con PTE, la reacción c) formó el producto de 264 pb deseado. No obstante, como fue evidente a para los controles negativos, las reacciones del cebador con PDE contenían una cantidad significativa de formación de dímero de cebadores, mientras que las reacciones del cebador con PTE no la contenían. En general, el beneficio de los cebadores modificados con PTE en la RT-PCR de dos etapas es evidente, los cebadores modificados suprimían la formación de dímeros de cebadores no deseados.

Los mismos pares de cebadores también se usaron en un protocolo de RT-PCR de una etapa. Como en el protocolo de dos etapas se prepararon dos conjuntos de reacciones. El primer conjunto contenía cebadores con PDE no modificados a 0,5  $\mu$ M y el segundo conjunto contenía cebadores modificados con PTE a 0,5  $\mu$ M. Cada conjunto constaba de tres reacciones, siendo las reacciones b) y c) controles negativos. La reacción a) consistió en 0,25  $\mu$ g de ARN total de hígado humano y 25 U de transcriptasa inversa de MMLV, la reacción b) consistió en 0,25  $\mu$ g de ARN total de hígado humano y 0 U de transcriptasa inversa de MMLV y la reacción c) consistió en 0  $\mu$ g de ARN total de hígado humano y 25 U de transcriptasa inversa de MMLV. Todas las reacciones contenían cebadores oligo(dT) a 5  $\mu$ M y 0,3 U de ADN polimerasa Taq y fueron de un volumen de 25  $\mu$ l. Las reacciones se incubaron del siguiente modo: 42°C durante 60 minutos; 94°C durante 5 minutos; [94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 5 minutos] 30 veces; y 72°C durante 5 minutos. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ambos pares de cebadores, los controles sin RT, b) parecieron los mismos, con un ligero borrón en el gel, que probablemente se deba a la presencia de ARN total en las muestras. Para los controles sin ARN c) los cebadores con PDE mostraron una banda de dímero de cebador de bajo peso molecular, mientras que los cebadores con PTE no mostraron ningún producto de amplificación detectable. Es probable que la banda del dímero de cebador de bajo peso molecular se deba a la extensión mediada por transcriptasa inversa de los cebadores para PCR con PDE, como han tratado Peters, I.R., y col., 286 Journal of Immunological Methods 203-217 (2004). Para la reacción a) ambos pares de cebadores formaron el producto de 264 pb deseados. No obstante, el producto de reacción para los cebadores con PDE contenía varios productos de amplificación, incluida la banda del dímero de cebador observada en la reacción b), mientras que los cebadores con PTE formaron el producto de reacción deseado sin ningún producto de amplificación adicional. El uso de cebadores modificados con PTE en reacciones enzimáticas secuenciales, tal como RT-PCR de una etapa, permite que los cebadores específicos de gen se bloqueen parcial o completamente de la extensión durante la reacción de transcripción inversa a menor temperatura.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente.

Otras formas de realización se exponen en las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TRILINK BIOTECHNOLOGIES

5 <120> CEBADORES OLIGONUCLEOTÍDICOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE PARA LA AMPLIFICACIÓN DE  
ÁCIDO NUCLEICO

<130> p39903

10 <140> 07 777161.6

<141> 17/05/2007

<150> 60/810,665

<151> 01/06/2006

15

<160> 17

<170> PatentIn ver. 3.3

20 <210> 1

<211> 4

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 1

gcat 4

30

<210> 2

<211> 4

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 2

5 gcat 4

<210> 3

<211> 4

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 3

gact 4

<210> 4

<211> 4

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25

<400> 4 gcat 4

<210> 5

<211> 4

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35

<400> 5

gact 4

<210> 6

5 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 6

gaattgggtg tcaacatagc agaat 25

15 <210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 7

gaattgggtg tcaacatagc agaat 25

25

<210> 8

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 8

35 aatactatgg tccacacaac tattgct 27

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

10 <400> 9

aatactatg tccacacaac tattgct 27

<210> 10

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

20

<400> 10

aaggagctgg ctgacatttt cg 22

<210> 11

25 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 11

aaggagctgg ctgacatttt cg 22

35 <210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 12

cgggatatcg acatttctgc acc 23

10 <210> 13

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 13

cgggatatcg acatttctgc acc 23

20

<210>14

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 14

30 taatgcctat tctgctatgt tggcacccaa ttctttttt 40

<210> 15

<211> 40

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 15

aatcttagca atagttgtgt ggacatagtttttttt 40

<210> 16

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

15

<400> 16

gagtgattcg cgtgggtacc 20

<210> 17

20 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 17

ggctccgatg gtgaagcc 18



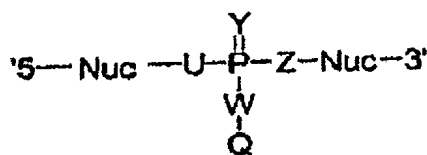
REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho procedimiento:

amplificar el ácido nucleico usando un cebador oligonucleotídico modificado,

5 en el que dicho cebador oligonucleotídico modificado comprende un grupo de modificación en uno o más enlaces internucleotídicos;

en el que dicho grupo de modificación puede disociarse térmicamente de forma no reversible; y en el que dicho cebador oligonucleotídico modificado tiene la estructura I siguiente



10

en la que:

Nuc es un nucleósido dentro de la secuencia del cebador;

U y Z son, de forma independiente, O, S, Se, NR<sup>9</sup>, o CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>;

15 R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> son cada uno de forma independiente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1-20 átomos de carbono, en el que cada uno puede incluir independientemente al menos un sustituyente seleccionado de halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, amido o un marcador detectable;

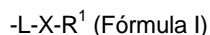
Y es O, S o Se;

W es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Se, C(O), C(S), C(O)NH, NH o NR<sup>9</sup>; y

20 Q es un grupo de modificación que comprende uno o más grupos térmicamente escindibles.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:

(1) dicho grupo de modificación, Q, comprende uno o más grupos de modificación seleccionados del grupo que consiste en

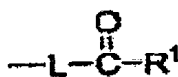


25 en la que:

L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono;

X es O, S(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O), C(S) o C(O)NH; y

30 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;



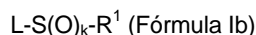
(Fórmula Ia)

en la que

L es un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

35 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo,

alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

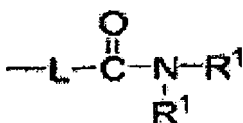


en la que:

k es un número entero de 0-2;

5 L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

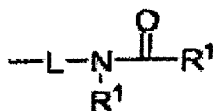


10 (Fórmula Ic)

en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

15 cada R<sup>1</sup> es, de forma independiente, hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;



(Fórmula Id)

20 en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

25  $-L-R^2$  (Fórmula II)

en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

R<sup>2</sup> es hidrógeno, ciano o un carbociclo, heterociclo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido que tiene entre 5 y 10 átomos;

30  $-L^a-A-L^b-B$  (Fórmula III)

en la que:

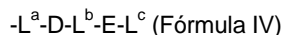
L<sup>a</sup> y L<sup>b</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente de un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 8 átomos de carbono;

A es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Se, CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, NR<sup>3</sup>, C(O), C(S) o CNR<sup>3</sup>;

35 B es C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, OR<sup>3</sup> o SR<sup>3</sup>; y

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son, cada uno de forma independiente, hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene

1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo; y



5 en la que:

$L^a$ ,  $L^b$  y  $L^c$  se seleccionan cada uno de forma independiente de un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 8 átomos de carbono;

D es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, y NR<sup>5</sup>;

E es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, y NR<sup>6</sup>;

10 F es hidrógeno, C(O)R<sup>7</sup>, C(S)R<sup>7</sup>, C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, OR<sup>7</sup> y SR<sup>7</sup>;

15 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden ser, cada uno de forma independiente, hidrógeno, arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi o amino, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden cooperar para formar un anillo mono o bicíclico que consiste en 5-10 átomos de carbono e incluye D, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, E y L<sup>b</sup>, a condición de que cuando R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> cooperan para formar un anillo, n es de 0-2; y R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente, del grupo que consiste en arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, amido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.

(2) dicho grupo de modificación, Q comprende:



en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono;

X es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O), C(S) o C(O)NH; y

25 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

(3) dicho grupo de modificación, Q comprende:



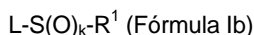
(Fórmula Ia)

30 en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

35 (4) dicho grupo de modificación, Q comprende:



en la que:

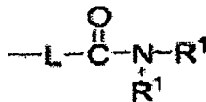
k es un número entero de 0-2;

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

40 R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden

incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

(5) dicho grupo de modificación, Q comprende:



5

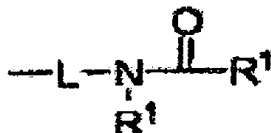
(Fórmula Ic)

en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

10 cada R<sup>1</sup> es, de forma independiente, hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

(6) dicho grupo de modificación, Q comprende:



(Fórmula Id)

15 en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

20 (7) dicho grupo de modificación, Q comprende:

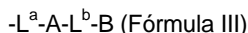


en la que:

L es un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono; y

25 R<sup>2</sup> es hidrógeno, ciano o un carbociclo, heterociclo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido que tiene entre 5 y 10 átomos;

(8) dicho grupo de modificación, Q comprende:



en la que:

30 L<sup>a</sup> y L<sup>b</sup> son cada uno de forma independiente un enlace o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene entre 1 y 8 átomos de carbono;

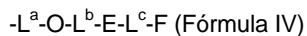
A es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Se, CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, NR<sup>3</sup>, C(O), C(S) o CNR<sup>3</sup>;

B es C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, OR<sup>3</sup> o SR<sup>3</sup>; y

35 R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son, cada uno de forma independiente, hidrógeno o un grupo hidrocarbilenos lineal o ramificado que tiene 1-20 átomos de carbono que pueden incluir, opcionalmente, al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo,

heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

(9) dicho grupo de modificación, Q comprende:



en la que:

- 5 L<sup>a</sup>, L<sup>b</sup> y L<sup>c</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente de un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 8 átomos de carbono;
- D es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, y NR<sup>5</sup>;
- E es O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, y NR<sup>6</sup>;
- F es hidrógeno, C(O)R<sup>7</sup>, C(S)R<sup>7</sup>, C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, OR<sup>7</sup> y SR<sup>7</sup>;
- 10 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden ser, cada uno de forma independiente, hidrógeno, arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi o amino, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> pueden cooperar para formar un anillo mono o bicíclico que consiste en 5-10 átomos de carbono e incluye D, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, E y L<sup>b</sup>, a condición de que cuando R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> cooperan para formar un anillo, n es de 0-2; y R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente, del grupo que consiste en hidrógeno arilo, alquilo, halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, amido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.
- 15 (10) dicho grupo de modificación, Q, comprende uno o más restos químicos seleccionados del grupo que consiste en 4-oxo-1-hexilo, 4-oxo-1-pentilo, 5-oxo-1-hexilo, 6-oxo-1-heptilo, 1-metil-4-oxo-pentilo, 4-metil-1-butilo, 5-metil-4-oxohexilo, 1-etil-4-oxo-pentilo, N-(2-hidroxietil)ftalimido, 2-(N-acetil-N-metil)aminoetilo, 2-(N-formil-N-metil)aminoetilo, 2-metil-5-oxo-hexilo, 1,1-dimetil-4-oxo-pentilo, 4-oxo-1-octilo, 4-oxo-1-tetradecilo, 4-oxo-1-eicosamilo y 3-(N-terc-butilcarboxamido)-1-propilo;
- (11) dicho cebador oligonucleótido modificado comprende un enlace internucleotídico fosfotriéster;
- (12) dicho cebador oligonucleótido modificado comprende dos o más grupos de modificación en la posición n, n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 o n-6; en el que n es el enlace internucleotídico 3' terminal;
- 25 (13) dicho cebador oligonucleótido modificado comprende dos o más grupos de modificación;
- (14) dicha amplificación de ácido nucleico comprende una polimerasa de inicio en caliente;
- (15) dicho cebador oligonucleótido modificado es al menos un 90% quiralmente puro; o
- (16) dicho cebador oligonucleótido modificado comprende un marcador detectable;
- 30 3.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha amplificación comprende la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha PCR comprende PCR multiplex.
- 5.- El procedimiento de la reivindicación 4, en el que:
- (1) una primera diana se amplifica usando cebadores no modificados y una segunda diana se amplifica usando cebadores no modificados; o
- 35 (2) una primera diana se amplifica usando uno o más cebadores modificados con un primer grupo de modificación y una segunda diana se amplifica usando uno o más cebadores modificados con un segundo grupo de modificación, en el que dicho primero y segundo grupo de modificación son diferentes.
- 6.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha amplificación comprende transcriptasa inversa (RT).
- 7.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha amplificación comprende posteriores reacciones enzimáticas en un único tubo.
- 8.- el procedimiento de la reivindicación 7, en el que dichas posteriores reacciones enzimáticas comprenden la transcriptasa inversa (RT) como primera reacción enzimática y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como segunda reacción enzimática.
- 45 9.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha reacción RT comprende amplificar con uno o más cebadores no modificados y dicha reacción PCR comprende amplificar con uno o más cebadores modificados.

10.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha reacción RT comprende amplificar con uno o más de un primer cebador modificado y dicha reacción PCR comprende amplificar con uno o más de un segundo cebador modificado.

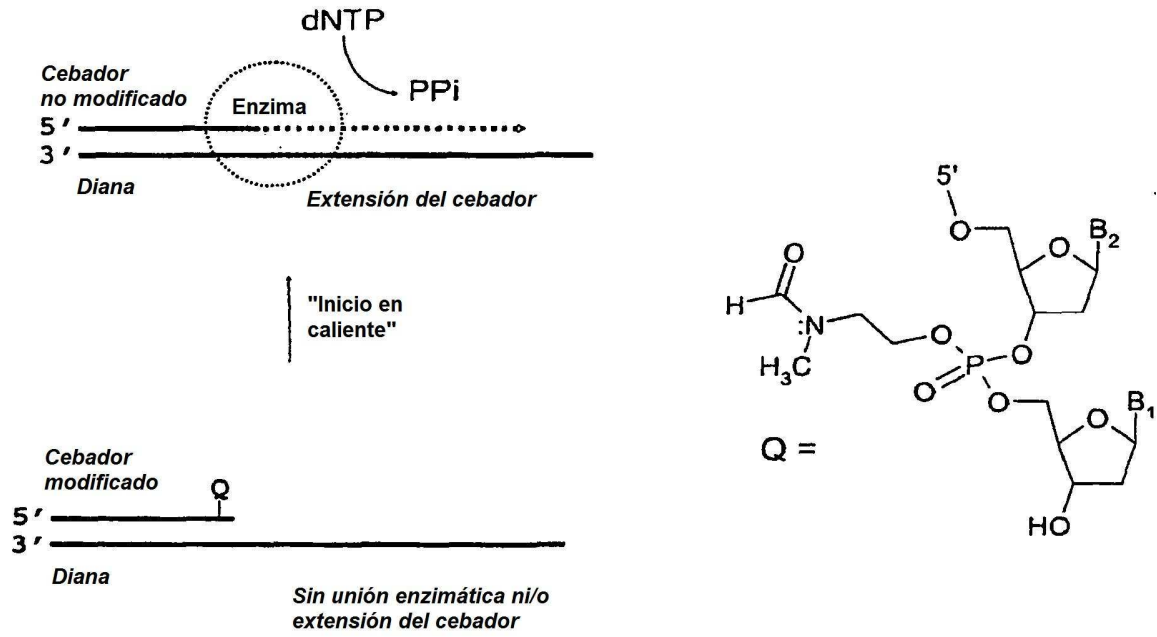


Figura 1

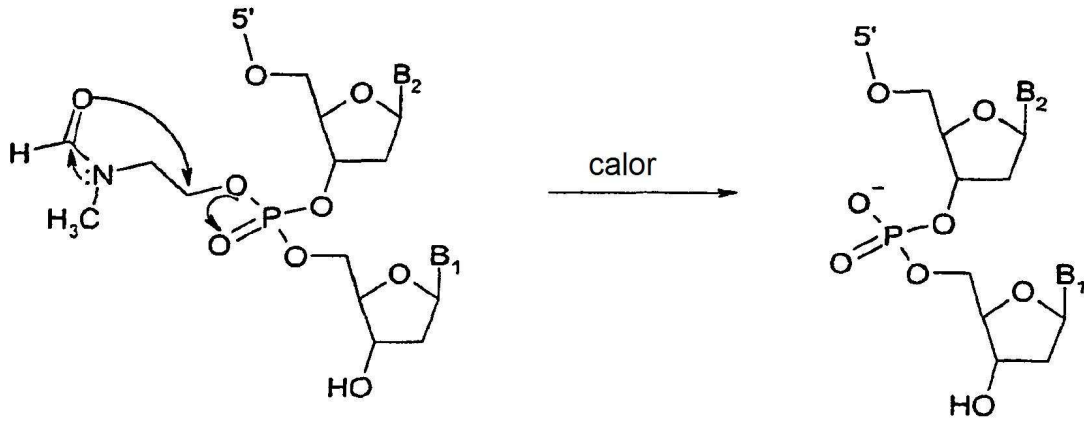
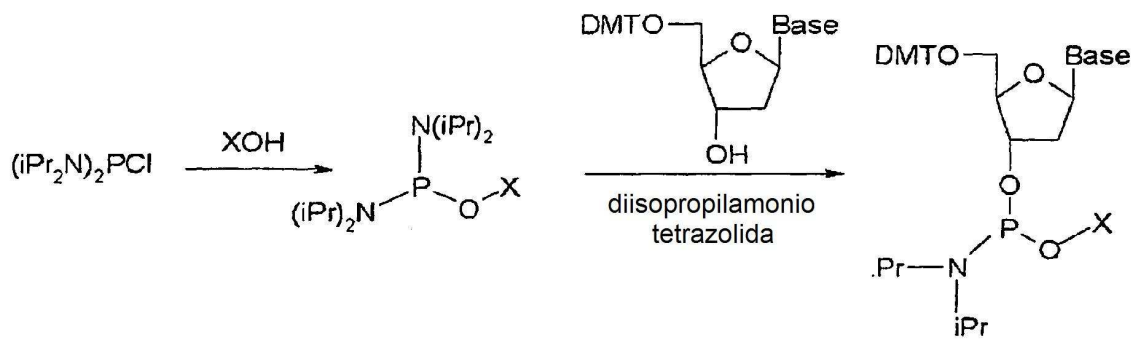
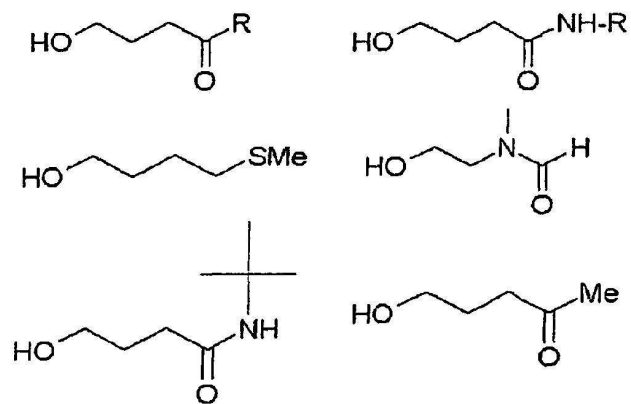


Figura 2



Base: pacdA, ipacdG, pacdC, dT

XOH:



R= Me, alquilo de cadena larga o biotina

Figura 3