

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 542**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09719407 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2265729**

54 Título: **Amplificación y secuenciación de dianas con cebadores que comprenden unidades monoméricas formadoras de tríplex**

30 Prioridad:

**10.03.2008 DK 200800366**

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

**16.12.2013**

73 Titular/es:

**QUANTIBACT A/S (100.0%)  
Kettegårds Allé 30  
2650 Hvidovre, DK**

72 Inventor/es:

**LISBY, GORM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 434 542 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

Amplificación y secuenciación de dianas con cebadores que comprenden unidades monoméricas formadoras de tríplex

5

**Antecedentes**

La detección, la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos son procedimientos cruciales en biología molecular, en investigación así como en diagnósticos clínicos y los reactivos clave en dichos procedimientos son oligonucleótidos que actúan como cebadores y/o sondas.

10

De gran importancia para los cebadores y las sondas son su especificidad de secuencia y también su afinidad por un ácido nucleico complementario. Estas características se pueden modular mediante factores intrínsecos al oligonucleótido y factores extrínsecos al oligonucleótido. Los factores intrínsecos son por ejemplo la longitud y la composición de la secuencia de ácidos nucleicos de los oligonucleótidos. Además los usos de nucleótidos no naturales o modificaciones en la estructura son factores intrínsecos. No obstante, el número de nucleótidos no naturales y unidades estructurales disponibles es limitado. De acuerdo con ello, existe la necesidad de oligonucleótidos con modificaciones novedosas que se puedan usar en procedimientos de biología molecular.

15

La solicitud de patente WO 2006/125447 describió una unidad monomérica formadora de tríplex de la fórmula Z (que se describe más adelante) y demostró características favorables de un oligonucleótido que comprende una unidad monomérica formadora de tríplex con respecto a la formación de tríplex con un ácido nucleico bicatenario. En base a las características de formación de tríplex, los autores de la solicitud de patente mencionada anteriormente sugieren usar el oligonucleótido para la detección, el diagnóstico y el tratamiento. No se proporcionaron detalles ni datos de dichos usos.

20

25

Filichev y cols., (Filichev VV, 2005) describieron la misma unidad monomérica formadora de tríplex que el documento WO 2006/125447 y encontraron estabilización del dúplex paralelo y del tríplex paralelo mediante incorporación de la unidad monomérica formadora de tríplex. Además, encontraron desestabilización de de los dúplex ARN/ADN y ADN/ADN de tipo Watson-Crick cuando las unidades monoméricas formadoras de tríplex se insertaron en un oligonucleótido, en comparación con el oligonucleótido nativo.

30

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1: La síntesis de monómeros de ácidos nucleicos intercalantes que contienen un grupo 1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-ilo.

35

Figura 2: La síntesis de monómero de ácido nucleico intercalante que contiene una modificación de tipo Sonogahira (i) Reacción de 8 con 3 o reacción de 9 con 2 ambas usando Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI, DMF/Et<sub>3</sub>N, Ar. (ii) NH<sub>4</sub>OH al 32 % o solución etanólica de tris(2-aminoetil)amina al 50 %, a temperatura ambiente durante 2 horas después a 55 °C durante la noche. (iii) RP-HPLC; AcOH acuoso al 80 %, AcONa acuoso 3 M, EtOH al 99 %.

40

Figura 3: La síntesis de 2- y 4-etinilpirenos en las posiciones para y orto de (R)-1-O-fenilmetilglicerol y su incorporación en oligonucleótidos

45

Reactivo y condiciones para la síntesis: i) H<sub>2</sub> (16211999,45 pascales (160 atm)), Pd al 10 %/C, EtOAc, 60 °C, 24 horas; ii) Ac<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 °C; iii) 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), tolueno, 110 °C, 1 hora; iv) DMF, POCL<sub>3</sub>; v) KOH, dioxano, reflujo, 2 horas.

Figura 4: Un grupo 1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-ilo.

50

**Sumario de la invención**

Los autores de la presente invención han descubierto que la incorporación de una unidad monomérica formadora de tríplex (en el presente documento también denominada monómero TINA) en oligonucleótidos da sorprendentemente una serie de características favorables. Además, han descubierto que los oligonucleótidos que comprende un monómero formador de tríplex se pueden usar como sustratos de manipulaciones enzimáticas tales como prolongación de cebadores.

55

Por tanto, un primer aspecto es un oligonucleótido de una longitud entre 5 y 60 nt (nucleótidos), que comprende al menos una unidad monomérica TINA de la fórmula Z, en el que dicho(s) monómero(s) se localiza(n) en una posición que tiene al menos 1 monómero desde el extremo 3' del oligonucleótido.

60

Dicho oligonucleótido se puede usar en varios procedimientos biológicos moleculares.

Por tanto, un segundo aspecto de la invención es un procedimiento que comprende las etapas de

65

- a. Proporcionar un ácido nucleico plantilla
- b. Proporcionar un primer cebador
- c. Proporcionar una polimerasa
- d. Proporcionar nucleótidos trifosfatos
- 5 e. Mezclar los componentes de las etapas a-d y proporcionar condiciones, que permitan al cebador hibridarse con la plantilla

-en el que el cebador es preferentemente un oligonucleótido de la invención.

- 10 Las etapas puede ser parte de una técnica de biología molecular, tal como una reacción de secuenciación, una reacción de transcripción o un procedimiento de amplificación del ácido nucleico diana (NAT) -tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) o reacción en cadena de la ligasa (LCR). Si las etapas son parte de una reacción NAT, la reacción NAT se puede realizar simplemente para
- 15 amplificar una región diana del ácido nucleico plantilla. Como alternativa, la NAT se puede realizar de forma cuantitativa para determinar la cantidad de una región diana del ácido nucleico plantilla. Una reacción NAT cuantitativa (p. ej., PCR) puede comprender sondas de detección que pueden ser oligonucleótidos de la invención.

20 Los oligonucleótidos de la invención son ventajosos porque permiten la modulación de la temperatura de fusión de un oligonucleótido, tienen una especificidad de secuencia mejorada y pueden formar triples mediante apareamiento de Hoogsteen o apareamiento de bases de Hoogsteen inverso con ácidos nucleicos bicatenarios. Además, algunas realizaciones de los oligonucleótidos de la invención tienen características de fluorescencia útiles.

### Divulgación de la invención

25 **Oligonucleótido**

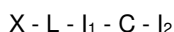
En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un oligonucleótido de una longitud entre 5 y 60 nt que comprende un monómero TINA de la fórmula Z, en el que dicho monómero TINA está localizado en una posición

30 que tiene al menos 1 monómero desde el extremo 3' del oligonucleótido.

Incluso se prefiere más una longitud entre 8 y 50 nt y lo que más se prefiere es una longitud entre 10 y 40 nt.

Unidad monomérica formadora de tríplex, Z

35 Z se puede describir mediante la estructura general:



40 en la que X es una unidad monomérica estructural que se puede incorporar en la estructura de un oligonucleótido o un análogo nucleotídico, o PNA, o análogos de PNA, L es un engarce,  $I_1$  es un primer intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de las mismas, C es un conjugador opcional e  $I_2$  es un segundo intercalante que comprende un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de las mismas.

45

Un monómero de apilación de bases flexible (Z) comprende al menos dos sistemas intercalantes  $I_1$  e  $I_2$  que están unidos mediante un conjugador C que proporciona la rigidez estructural y la flexibilidad a la torsión necesarias. Lo último se cree que es importante para ayudar a los intercalantes a ajustarse ellos mismos en una posición adecuada

50 dentro de la hélice de ácido nucleico.

En una realización preferida, la estructura X es capaz de incorporarse dentro de un oligonucleótido de ADN, ARN, HNA, MNA, ANA, LNA, CAN, INA, CeNA, TNA, (2'-NH)-TNA, (3'-NH)-TNA,  $\alpha$ -L-Ribo-LNA,  $\alpha$ -L-Xilo-LNA,  $\beta$ -D-Ribo-LNA,  $\beta$ -D-Xilo-LNA, [3.2.1]-LNA, Biciclo-ADN, 6-Amino-Biciclo-ADN, 5-epi-Biciclo-ADN,  $\alpha$ -Biciclo-ADN, Triciclo-ADN, Biciclo[4.3.0]-ADN, Vícialo[3.2.1]-ADN, Biciclo[4.3.0]amida-ADN,  $\beta$ -D-Ribopiranosil-NA,  $\alpha$ -L-Lixopiranosil-NA, 2'-R-ARN, 2'-OR-ARN, 2'-AE-ARN,  $\alpha$ -L-ARN,  $\beta$ -D-ARN y combinaciones y modificaciones de los mismos.

55

En otra realización, la unidad monomérica estructural X comprende un alquilendiol, tal como etilenglicol o 1-O-metilenglicerol que opcionalmente tiene el alquilendiol parcialmente comprendido en un sistema anular, tal como glicón. Por ejemplo, el monómero estructural X puede ser una parte de anillos de cuatro, cinco o seis miembros que, en última instancia, tienen heteroátomos seleccionados de nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno. Preferentemente, el alquilendiol une directamente las unidades monoméricas adyacentes del oligonucleótido y debe entenderse que en la presente realización, el alquilendiol puede seguir formando parte de un sistema anular tal como por ejemplo glicón.

60

65 En una realización, el engarce L del monómero flexible de apilación de bases comprende 0-60 átomos.

En otra realización, L comprende una cadena o un anillo o combinaciones de los mismos y/o sustituciones de los mismos.

- 5 En otra realización más, L comprende una cadena de alquilo o una cadena de oxoalquilo o una cadena de azaalquilo o una cadena de tialquilo o un grupo carboxamida o un grupo tiocarboxamida o un grupo sulfonamida o combinaciones de los mismos.

- 10 La combinación de X y L proporciona un sistema que coloca al sistema intercalante de  $I_1$ -C- $I_2$  en el núcleo de las hélices de ácido nucleico con capacidad para apilarse con bases de ácido nucleico.

$I_1$  del monómero de aplicación de bases flexible es un primer intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleicas del ADN, ARN o análogos de las mismas.

- 15 En una realización,  $I_1$  es un sistema anular aromático monocíclico o policíclico seleccionado opcionalmente del grupo de un benceno, naftaleno, azuleno, sistemas anulares heteroaromáticos bicíclicos y sustituciones de los mismos.

- 20 En una realización preferida,  $I_1$  se coloca con L y C en la posición 1,2 del sistema anular aromático monocíclico o policíclico.

En otra realización más,  $I_1$  se coloca con L y C en la posición 1,3 del sistema anular aromático monocíclico o policíclico.

- 25 En otra realización,  $I_1$  se coloca con L y C en la posición 1,4 del sistema anular aromático monocíclico o policíclico.

En una realización más preferida  $I_1$  es un anillo de benceno con L y C en una posición orto o para.

- 30 C del monómero de aplicación de bases flexible es un conjugador opcional. En una realización preferida en la que C es no opcional, C se selecciona del grupo de un alquilo de 1 a 12 carbonos, alqueno de 2 a 12 carbonos, alquino de 2 a 25 carbonos o diazo o combinaciones de los mismos con una longitud de no más de 25 átomos de carbono y/o nitrógeno.

- 35 En una realización alternativa, el monómero de aplicación de bases flexible no contiene ningún conjugador. Por tanto,  $I_1$  e  $I_2$  pueden estar unidos directamente, por ejemplo mediante un sistema conjugado.

En otra realización, C se selecciona del grupo que consiste en anillos aromáticos de cadena lineal o de cadena ramificada o monocíclicos y sustituciones de los mismos que en última instancia tienen heteroátomos seleccionados de nitrógeno, fósforo y oxígeno.

- 40 En otra forma de realización más, el alqueno de C es un acetileno o varios acetilenos.

- 45 En una realización preferida, la longitud de unidad de la unidad monomérica estructural X que incluye un átomo de fósforo es menor de 6 átomos, en la que la longitud de la unidad estructural es la distancia más corta de un monómero a otro.

- 50 En una realización preferida, el resto de unión L tiene una longitud de al menos 2 átomos y en última instancia posee heteroátomos seleccionados de nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno. Preferentemente, el resto de unión L tiene una longitud entre 2 y 10 átomos, más entre 2 y 5 átomos. En una realización más preferida, el resto de unión tiene una longitud de 3 átomos correspondiente a 5 enlaces entre X e  $I_1$ .

$I_2$  del monómero de aplicación de bases flexible es un segundo intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleicas del ADN, ARN o análogos de los mismos.

- 55 En una realización preferida,  $I_2$  se selecciona del grupo de sistemas anulares aromáticos bicíclicos, sistemas anulares aromáticos tricíclicos, sistemas anulares aromáticos tetracíclicos, sistemas anulares aromáticos pentacíclicos y análogos heteroaromáticos de los mismos y sustituciones de los mismos.

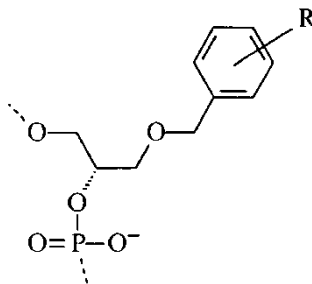
- 60 En una realización particular,  $I_2$  es un grupo 1*H*-fenantro[9,10-*d*]imidazol-2-ilo o pireno (figura 4).

En una realización preferida, el monómero de aplicación de bases flexible es parte de un oligonucleótido o análogo del oligonucleótido.

- 65 En otra realización preferida, el monómero de aplicación de bases flexible se adapta para incorporar en un oligonucleótido.

En una realización preferida, el monómero de apilación de bases flexible para incorporar en un oligonucleótido se selecciona del grupo de una fosforoamidita, una fosforodiamidita, un fosforodiestéer, un fosforotriestéer, un fosfonato, un H-fosfonato, un fosfito, un clorofosfito, una clorofosforoamidita, una fosfonoamidita, una fosfonocloridita, un trifosfato, un bifosfato.

En una realización más preferida, el monómero de apilación de bases flexible (Z) se puede describir mediante la fórmula:



en la que R se selecciona del grupo de ariletinilo, pirenetinilo y 1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-ilo, el grupo R puede estar sustituido en la posición orto, meta o para del benceno. Más preferidas son las posiciones orto y para.

### Realizaciones de oligonucleótidos

El oligonucleótido de la invención tiene varias aplicaciones sorprendentes y beneficiosas, como quedará claro a partir de otros aspectos de la invención y de los ejemplos. Un uso principal de dicho oligonucleótido es para la prolongación de cebadores en técnicas de biología molecular tales como amplificación de la diana de ácido nucleico (p. ej., PCR) o secuenciación de ácido nucleico.

En una realización preferida, el oligonucleótido comprende una serie de monómeros TINA seleccionados del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 y en el que dichos monómeros TINA están localizados en una posición que tiene al menos 1 monómero desde el extremo 3' del oligonucleótido, es decir el primer monómero del oligonucleótido no es un monómero TINA.

Preferentemente, los monómeros TINA no se colocan adyacentes entre sí, es decir están separados por al menos un monómero nucleotídico del oligonucleótido. Incluso se prefiere más una separación de 2 o 3 unidades monoméricas nucleotídicas. Se prefiere más una separación de 5 o 6 o 10, 11 o 12 que corresponden a respectivamente  $\frac{1}{2}$  giro de hélice o un giro de hélice.

Dado que una polimerasa habitualmente siente las características del cebador hibridado con la plantilla, el monómero TINA se localiza preferentemente al menos 1 monómero desde el extremo 3' del oligonucleótido. Por otro lado, la polimerasa no aceptará al oligonucleótido como cebador. La posición que se puede permitir puede variar de una polimerasa a otra polimerasa.

Por tanto, en una realización preferida, los monómeros TINA se localizan en una posición seleccionada del grupo que consiste en al menos 2 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 3 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 4 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 5 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 6 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 7 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 8 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 9 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 10 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 11 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 12 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 13 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido, al menos 14 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido y al menos 15 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido.

Lo más preferido es una posición de al menos 6 monómeros desde el extremo 3' del oligonucleótido.

En otra realización, las unidades monoméricas TINA se localizan en una posición que no está a más de 5 monómeros del extremo 5' del oligonucleótido, tal como 4, 3, 2 y 1 monómeros desde el extremo 5' del oligonucleótido. En una realización, el monómero TINA se localiza en el extremo 5' del oligonucleótido.

Preferentemente, el oligonucleótido de la invención comprende además unidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste en unidades de ADN, unidades de ARN, unidades de LNA y unidades 2'-OH-modificadas. Como se entenderá, la expresión unidad monomérica se usa para las unidades repetitivas de un oligonucleótido, es decir habitualmente nucleótidos. Una unidad monomérica puede ser también un monómero de PNA (monómero de ácido nucleico peptídico).

5 Se puede desear que la incorporación de unidades monoméricas no naturales tales como monómeros de LNA, monómeros de PNA o unidades 2'-OH-modificadas incremente la temperatura de fusión del oligonucleótido hibridado a una hebra plantilla complementaria. Algunas unidades monoméricas también se pueden usar para disminuir la temperatura de fusión del oligonucleótido hibridado con una hebra plantilla complementaria. Si el oligonucleótido se va a usar en extractos celulares, las unidades monoméricas modificadas también se pueden usar para prevenir o reducir la degradación enzimática del oligonucleótido.

10 En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención no comprende ninguna unidad monomérica de ARN sin modificar. La presencia de unidades monoméricas de ARN en un oligonucleótido a menudo disminuirá la estabilidad, es decir hace al oligonucleótido más propenso a la degradación nucleolítica.

15 En una realización, el oligonucleótido de la invención comprende una tira contigua de 3-desoxinucleótidos en el extremo 3 para asegurar la iniciación adecuada de la polimerización. Esto se desea porque algunas ADN y ARN polimerasas tienen un requerimiento de monómeros de ADN en el extremo 3' del cebador. No obstante, la mayoría de las polimerasas no tienen este requerimiento.

20 El oligonucleótido de la invención puede comprender un sitio de restricción. Una restricción es una secuencia que permite que una enzima de restricción escinda el oligonucleótido. Habitualmente, la secuencia de restricción es palindrómica y habitualmente, la enzima de restricción escinde los ácidos nucleicos bicatenarios, en los que el oligonucleótido debería estar apareado con sus bases con un oligonucleótido complementario para la digestión de restricción. Algunas enzimas de restricción también pueden digerir ácidos nucleicos monocatenarios. Ejemplos de enzimas de restricción son EcoRI, BamHI y XhoI. Cuando el oligonucleótido de la invención se usa para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los sitios de restricción se pueden incorporar en el oligonucleótido de la invención para facilitar la clonación del producto de la PCR. El sitio de restricción normalmente estará presente en el extremo 5' del oligonucleótido.

### Marcadores

30 El oligonucleótido de la invención puede comprender un pigmento indicador. Preferentemente, el pigmento indicador se selecciona del grupo que consiste en FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, SYBR® Green, 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, Fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, Rojo Texas, Rodamina, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, 6-CarboxiRodamina 6G, Alexa Flúor, Verde Oregón 488, Verde Oregón 500 y Verde Oregón 514.

35 Preferentemente, el oligonucleótido también comprende un pigmento inactivador. En una realización preferida, el pigmento inactivador se selecciona del grupo que consiste en TAMRA<sup>TM</sup>, Black Hole Quencher<sup>TM</sup>, DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, DDQ I, DDQ II y Eclipse Dark Quencher.

40 El uso de pigmentos indicadores e inactivadores es deseable porque permite varios tipos de cuantificaciones, tanto cuando el oligonucleótido de la invención se usa como un cebador como cuando el oligonucleótido de la invención se usa como una sonda de detección durante o después del procedimiento NAT.

45 Habitualmente, el pigmento indicador y el pigmento inactivador se localizan cerca uno de otro en el oligonucleótido de la invención, lo que permite que el pigmento inactivador inactive la fluorescencia inducida por láser emitida por el indicador. Cuando el oligonucleótido se une a una hebra plantilla complementaria, el pigmento indicador y el pigmento inactivador se separan uno de otro de un modo tal que el inactivador ya no inactiva la señal del indicador.

50 Por tanto, en una realización, el oligonucleótido es capaz de formar una estructura tallo-bucle, en la que el pigmento inactivador y el indicador se acercan en el tallo. En una realización, el oligonucleótido es una denominada baliza molecular. El inactivador y el indicador ya no están cerca cuando las bases de la baliza molecular se aparean con una hebra plantilla. Por tanto la señal inducida por láser del pigmento indicador ya no se inactiva más. En otra realización, el oligonucleótido es lo que se denomina cebador escorpión. El cebador escorpión comprende un tallo-bucle que se vuelve a pegar cuando el cebador está prolongado. De este modo, el pigmento indicador y el inactivador ya no están cerca y la señal del pigmento indicador ya no se inactiva más.

55 En una realización alternativa, el pigmento indicador y el pigmento inactivador están presentes en dos oligonucleótidos diferentes. En esta realización, el indicador y el inactivador se acercan cuando las bases de los dos oligonucleótidos se aparean con sitios adyacentes en una hebra plantilla. Preferentemente, los dos oligonucleótidos están separados por no más de 3 nucleótidos.

60 En otra realización más, el oligonucleótido es lo que se denomina sonda taqman. La sonda taqman es complementaria a la región entre los dos sitios de unión al cebador del ácido nucleico plantilla y por tanto sus bases se aparean en esta región. Cuando una polimerasa prolonga un cebador se encontrará con la sonda taqman y a modo de su actividad 5-3' exonucleasa, digerirá la sonda taqman. De este modo, el pigmento indicador e inactivador de la sonda Taqman se separan entre sí.

En lugar de usar un pigmento indicador y un pigmento desactivador, se puede usar un así llamado par FRET (agente de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que comprende un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor. Cuando el fluoróforo donante se excita por una fuente de luz externa emite luz a una longitud de onda que excita el fluoróforo aceptor, que a su vez emite luz a una longitud de onda diferente que se puede detectar y medir.  
 5 La energía solamente se transfiere desde el donante al aceptor si el fluoróforo donante y el fluoróforo aceptor están muy cerca.

Entre los pares FRET preferidos se incluyen BFP-YFP, CFP-YFP, GFP-DsRed, GFP-Cy3, GFP-mOrange, YFP-RFP, FAM-ROX, FAM-Cy5, FAM-Hex, FAM-TAMRA y Cy3-Cy5.

10 En otra realización más, el oligonucleótido de la invención comprende una secuencia promotora de ARN, tal como una secuencia promotora de la ARN polimerasa de T7, una secuencia promotora de la ARN polimerasa de T3 o una secuencia promotora de la ARN polimerasa de SP6. Dicho oligonucleótido es de interés porque se puede hibridar con la hebra plantilla complementaria y dirigir transcripción de ARN de la hebra plantilla mediada por la ARN polimerasa. Por tanto, el oligonucleótido se puede usar para amplificación mediada por transcripción (TMA).  
 15

### Procedimiento de la invención

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento que comprende las etapas de

- 20 a. Proporcionar un ácido nucleico plantilla  
 b. Proporcionar un primer cebador  
 c. Proporcionar una polimerasa  
 d. Proporcionar nucleótidos trifosfatos  
 25 e. Mezclar los componentes de las etapas a-d y proporcionar condiciones, que permitan que el cebador se hibride con la plantilla

Preferentemente, el primer cebador es un oligonucleótido según se describe en las realizaciones del primer aspecto. Como quedará claro, diversas realizaciones del procedimiento del segundo aspecto requerirán o podrán requerir diferentes realizaciones de los oligonucleótidos descritos en el primer aspecto.  
 30

En una realización preferida, el procedimiento comprende además una etapa de:

- 35 f. En condiciones que permiten prolongación del cebador, prolongar el primer cebador hibridado con la plantilla.

En una realización alternativa descrita con más detalle a continuación, el cebador no se prolonga. En su lugar la base del cebador apareada con el ácido nucleico plantilla permite la transcripción del ARN. Por tanto, el cebador comprende una secuencia promotora de la ARN polimerasa.

### 40 Secuenciación de ácido nucleico

En una realización preferida, el cebador se marca con fluorescencia.

45 En otra realización, una fracción de los nucleótidos trifosfatos consiste en didesoxinucleótidos trifosfatos. En una realización preferida, los didesoxinucleótidos trifosfatos incluidos están marcados con fluorescencia, preferentemente con diferentes marcadores fluorescentes. Como reconocerá el experto en la técnica, el uso de un cebador fluorescente o didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia son útiles para secuenciar ácidos nucleicos.

50 En una realización relacionada, ni el cebador ni los didesoxinucleótidos están marcados con fluorescencia, ya que dicho marcaje es innecesario para la pirosecuenciación.

### Amplificación de la diana

En una realización preferida, el procedimiento comprende además las etapas de

- 55 g. Proporcionar un segundo cebador que es complementario al primer producto de prolongación de la etapa f  
 h. Desnaturalizar el producto de la etapa f  
 i. En condiciones de prolongación del cebador, prolongar el segundo cebador hibridado con el primer producto de prolongación  
 60

Por tanto, se puede hacer referencia a las etapas g-i como síntesis de la segunda hebra.

En una realización, el ácido nucleico plantilla es ARN, por lo que la polimerasa es una transcriptasa inversa.

65 En una realización preferida, el segundo cebador es un oligonucleótido de la invención y en otra realización más, tanto el primero como el segundo cebador son un oligonucleótido de la invención.

Si las etapas de desnaturalización, hibridación y prolongación se repiten, dichos ciclos permiten la amplificación de la secuencia diana y se reconocerá como PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

- 5 Preferentemente se realizan al menos 10 repeticiones de desnaturalización, hibridación y prolongación. Habitualmente se realizan 30-45 ciclos.

Como se producen ciclos de la temperatura, es importante que la polimerasa sea termoestable. Por otro lado, la polimerasa tendrá que añadirse después de cada etapa de desnaturalización.

10 **Amplificación mediada por transcripción (AMT)**

Como se ha mencionado, una realización de la invención implica transcripción. Por tanto, el primero o el segundo cebador comprende una secuencia promotora del ARN que permite la transcripción. El ácido nucleico plantilla puede ser ADN o ARN. Si la plantilla es ARN, para la síntesis de la primera hebra se usará una transcriptasa inversa. Tras la síntesis de la primera hebra se puede realizar la síntesis de la segunda hebra para generar una secuencia promotora bicatenaria. Como alternativa, se puede generar una secuencia promotora bicatenaria añadiendo un oligonucleótido complementario a la secuencia promotora de ARN del primer cebador.

20 **Amplificación por desplazamiento de hebra (ADH)**

En una realización preferida, el procedimiento NAT es una reacción de amplificación isotérmica por desplazamiento de hebra. En la presente realización, el procedimiento comprende un tercer y un cuarto cebador y también una enzima de restricción. El tercer y el cuarto cebador se denominan cebadores de protección que se usan para desplazar los productos de prolongación de los cebadores internos (los cebadores primero y segundo). Cuando los productos de prolongación de los cebadores internos se desplazan desde la hebra plantilla se pueden unir a otro cebador (interno) para la prolongación. Cuando este cebador se ha prolongado, la enzima de restricción produce una hebra del producto bicatenario. La realización de la mella es posible porque los cebadores internos comprenden un sitio de restricción. No obstante, solo se escindirán una de las hebras bien debido a la presencia de una modificación en el cebador, o bien debido a que el producto de prolongación contiene nucleótidos modificados (p. ej., dCTPaS) que solo permitirán que la enzima de restricción escinda el cebador original (que contiene nucleótidos no modificados). La modificación puede ser, por ejemplo, la presencia de un enlace fosforotioato. De este modo se permite la amplificación isotérmica exponencial del ácido nucleico. 1, 2, 3 o 4 de los cebadores pueden ser oligonucleótidos de la invención.

En una realización preferida, los cuatro cebadores son oligonucleótidos de la invención.

**Reacción en cadena de la ligasa (LCR)**

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) es un procedimiento de amplificación de ADN similar a la PCR. La LCR difiere de la PCR porque amplifica la molécula sonda en lugar de producir amplicones mediante polimerización de nucleótidos. Se usan dos sondas por cada hebra de ADN y se ligan para formar una única sonda. La LCR usa una enzima ADN polimerasa y una enzima ADN ligasa para dirigir la reacción. Como la PCR, la LCR requiere un ciclador térmico para dirigir la reacción y cada ciclo tiene como resultado una duplicación de la molécula de ácido nucleico diana. La LCR puede tener mayor especificidad que la PCR. El término LCR abarca tanto LCR convencional, como LCR por huecos, LCR por huecos asimétrica y variaciones de las mismas.

En una realización al menos una de las sondas de la LCR por hebra de ADN es un oligonucleótido de la invención.

En una realización concreta de la invención, cuatro sondas de LCR son oligonucleótidos de la invención.

**PCR cuantitativa**

Es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de realización de PCR cuantitativa (PCRc). Por tanto, en una realización, la mezcla de reacción comprende adicionalmente una sonda de detección que comprende una secuencia que es complementaria de una región entre el primero y el segundo sitios de unión del cebador del primero o el segundo productos de prolongación o al primero o al segundo sitio de unión del cebador.

En una realización preferida, la sonda es una sonda marcada doble que será digerida por la actividad 5'-3'-exonucleolítica de la polimerasa. Dicha sonda a menudo se denomina sonda Taqman. Como se ha descrito anteriormente, los marcadores de la sonda habitualmente son un pigmento indicador y un pigmento inactivador. Por tanto, el pigmento inactivador inactiva la señal del pigmento indicador si ambos marcadores están presentes en la misma sonda. Si se digiere la sonda, la señal del pigmento indicador ya no se inactivará. Por tanto, la señal del pigmento indicador correlacionará con la cantidad de hebra plantilla en la reacción, es decir, la señal se puede usar para seguir el curso de la reacción de amplificación.



En otra realización, la sonda puede formar una estructura tallo-bucle. También como se ha descrito anteriormente, un pigmento indicador y un pigmento inactivador se pueden localizar en el tallo de un modo tal que el inactivador inactiva la señal del pigmento indicador. Cuando las bases de la sonda se aparean con una hebra plantilla, el pigmento indicador y el pigmento inactivador se separan, por lo que la señal del pigmento indicador ya no se inactiva. Dichas sondas a menudo se denominan balizas moleculares.

Un tipo relacionado de sonda es la denominada sonda escorpión. Realmente estas sondas funcionan como cebadores y se repliegan cuando se prolongan y de este modo el pigmento inactivador se separa del pigmento indicador. Por tanto, el primero o el segundo cebador del procedimiento de la invención puede ser una sonda escorpión para facilitar la PCR.

Como una alternativa a tener la hebra plantilla que haga que el pigmento indicador y el pigmento inactivador de una sonda se separen, la hebra plantilla también puede hacer que se acerquen mucho. En dicha realización, los marcadores se pueden localizar en dos sondas separadas. Por tanto, en una realización preferida, la mezcla de reacción comprende además una segunda sonda que es complementaria a una región entre el primero y el segundo sitios de unión al cebador del primero o el segundo productos de prolongación y en la que las bases de la primera y la segunda sonda se aparearán con sitios adyacentes, de modo que une el extremo 3' de una sonda cerca del extremo 5' de la otra sonda.

Como se ha mencionado en lo que antecede, en lugar de usar un pigmento indicador y un pigmento inactivador, se puede usar un así llamado FRET (agente de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que comprende un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor.

Cualquiera de las sondas de detección mencionadas en lo que antecede podría ser un oligonucleótido de la invención y por tanto comprende una unidad Z.

En lugar de usar una sonda para detectar el producto de la reacción PCR se puede usar un pigmento indicador específico bicatenario. Por tanto, en una realización preferida, la mezcla de reacción comprende además pigmentos indicadores específicos bicatenarios, tales como SYBR verde I, SYBR verde II y SYBR oro.

### **Sonda de detección de tríplex**

En una realización preferida, la mezcla de reacción comprende además una sonda formadora de tríplex (SFT) que puede formar un tríplex con el producto de prolongación (p. ej., un producto de PCR). Si la sonda formadora de tríplex comprende una unidad monomérica Z, la formación de tríplex se puede medir directamente mediante emisión de luz excitada por una fuente de luz láser/externa.

No obstante, cualquiera de los sistemas de pigmentos indicadores anteriores, incluyendo pares FRET se puede usar junto con una sonda de detección formadora de tríplex. Por tanto, en una realización preferida, la sonda formadora de tríplex puede formar una estructura de tipo tallo-bucle en analogía con una baliza molecular.

También en analogía con las sondas de detección descritas anteriormente, la mezcla de reacción puede comprender una segunda sonda formadora de tríplex, que forma un tríplex adyacente al tríplex formado con la primera sonda formadora de tríplex. Preferentemente, la primera y la segunda sonda formadora de tríplex comprenden un pigmento indicador y un pigmento inactivador, respectivamente. Como alternativa, preferentemente comprenden un par FRET.

Las dos sondas formadoras de tríplex se pueden unir a través de un engarce tal como un engarce C18, un engarce PEG, un C9, un C7, un C6, un ciclohexano, un ciclooctano, un etilénóxido o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, la formación de tríplex se consigue mediante dos sondas de detección de oligonucleótidos separadas y el producto de prolongación monocatenario. Una sonda de detección de oligonucleótidos forma un dúplex antiparalelo con el producto de prolongación monocatenario del primero o el segundo cebador y una segunda sonda de detección de oligonucleótidos forma un tríplex paralelo con el dúplex antiparalelo que consiste en el producto de prolongación monocatenario y la primera sonda de detección de oligonucleótidos.

En otra realización más, el TFO se designa como: O1-L-O2, donde O1 y O2 son oligonucleótidos y L es un engarce (p. ej., como se ha descrito en lo que antecede) entre O1 y O2. O1 forma un dúplex antiparalelo con el producto de prolongación monocatenario del primero o del segundo cebador y O2 se vuelve a plegar sobre el dúplex antiparalelo para formar un tríplex paralelo.

En otra realización más, el TFO forma un tríplex paralelo con el producto de prolongación bicatenario.

Cualquiera de las sondas de detección mencionadas anteriormente puede ser un oligonucleótido de la invención y por tanto, comprender un monómero TINA de la fórmula Z para una especificidad de secuencia mejorada o una temperatura de fusión mayor de la sonda de detección de bases apareadas con una secuencia complementaria. En una realización, el monómero TINA se puede usar para disminuir la temperatura de fusión de la sonda de detección.

Cuando la sonda de detección es una sonda formadora de tríplex, se prefiere que comprenda una tira contigua de al menos 3 pirimidinas y preferentemente no más de 15 pirimidinas. En otra realización preferida, la sonda de detección comprende una tira contigua de al menos 3 purinas y preferentemente no más de 15 purinas.

5

#### **Estabilización de tríplex de hibridación de cebadores**

En una realización preferida en relación con NAT, la reacción comprende además un oligonucleótido formador de tríplex que puede formar un tríplex con la base del primer cebador apareada con una hebra plantilla o con la base del segundo cebador apareada con la hebra plantilla.

10

Por tanto, el oligonucleótido formador de tríplex estabilizará el apareamiento de bases entre el cebador y la plantilla.

15

En una realización preferida, el extremo 3' del cebador tiene una serie de nucleótidos que no están montados en la formación de tríplex, seleccionándose dicho número del grupo que consiste en al menos 5 nucleótidos, al menos 7 nucleótidos, al menos 10 nucleótidos, al menos 13 nucleótidos y al menos 16 nucleótidos.

20

En otra realización preferida, el número de nucleótidos que no están en la formación del tríplex es al menos 3 y de no más de 25 nt, preferentemente al menos 5 y no más de 20 nt, más preferentemente al menos 7 y no más de 18 nt.

25

Como alternativa al uso de un cebador y un TFO, ambas funcionalidades se pueden incluir en el mismo oligonucleótido. Por tanto, una primera parte del oligonucleótido forma un dúplex antiparalelo con el ácido nucleico plantilla y una segunda parte del oligonucleótido se pliega para formar un tríplex. Preferentemente, la primera parte del oligonucleótido comprende el extremo 3' del oligonucleótido. El oligonucleótido puede tener la fórmula: O1-L-O2, donde O1 y O2 son oligonucleótidos y L es un engarce entre O1 y O2.

#### **Referencias**

30

Filichev VV, P. E. (2005). Stable and selective formation of Hoogsteen-type triplexes and duplexes using twisted intercalating nucleic acids (TINA) prepared via postsynthetic Sonogashira solid-phase coupling reactions. *J Am Chem Soc*, 26 de octubre; 127 (42): 14849-58.

35

Osman A.M.A. y cols. Using an aryl phenanthroimidazole moiety as a conjugated flexible intercalator to improve the hybridization efficiency of a triplex-forming oligonucleotide. *Bioorg Med Chem*. 1 de diciembre de 2008; 16 (23):9937-47. Epub 2008 Oct 17.

40

Filichev VV. y cols. 1-, 2-, and 4-ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids: structure, thermal stability, and fluorescence relationship. *Chemistry*. 2008; 14 (32):9968-80.

Géci I y cols. Synthesis of twisted intercalating nucleic acids possessing acridine derivatives. Thermal stability studies. *Bioconjug Chem*. Julio-Agosto de 2006;17 (4):950-7.

#### **Ejemplos**

45

##### **Ejemplo 1**

#### **Los ácidos nucleicos intercalantes girados (TINA) aumentan sorprendentemente la Ta y la ΔTa en la PCR**

##### **Introducción:**

50

Ácidos nucleicos intercalantes girados (TINA) es un intercalante diseñado para estabilizar el ADN tríplex de Hoogsteen, pero, sorprendentemente también en condiciones especiales puede estabilizar las formaciones de dúplex antiparalelos de Watson-Crick. Aunque no se había previsto, se planificó investigar si los cebadores TINA-ADN podrán aumentar la temperatura de hibridación (Ta) y delta Ta (ΔTa) de cualquier reacción de PCR o variación del mismo (p. ej., PCR/RT-PCR cualitativa clásica ("de punto final"), PCR/RT-PCR cuantitativa clásica ("de punto final"), PCR/RT-PCR cualitativa en tiempo real, PCR/RT-PCR cuantitativa en tiempo real). El efecto de este incremento de la Ta y la ΔTa será doble: Un incremento en la Ta reducirá por sí mismo la probabilidad general de que un cebador de PCR hibride de forma inespecífica y el incremento en la ΔTa también reducirá la probabilidad de una unión inespecífica. Este incremento de la hibridación específica del cebador se puede usar aumentando la especificidad global de un ensayo dado. Como alternativa, "relajando" la rigurosidad de la hibridación del cebador se puede conseguir un incremento de la sensibilidad sin comprometer la especificidad en comparación con un ensayo idéntico sin TINA-ADN. Asimismo, con respecto a la sonda interna en las reacciones de PCR en tiempo real, un incremento en la Ta reducirá por sí mismo la probabilidad general de que una sonda de PCR hibride de forma inespecífica y el incremento en la ΔTa también reducirá la probabilidad de una unión inespecífica.

65

##### **Materiales y procedimientos:**

**Cebador par PCR de dúplex antiparalelo ADN / TINA-ADN:**

5 Como un modelo del sistema de PCR se eligió el sistema con control positivo interno en la Section for Molecular  
 Biology. Department of Clinical Microbiology, Hvidovre Hospital, Copenhagen Dinamarca. El ácido nucleico del  
 herpesvirus alfa de foca, herpesvirus de fócido de tipo 1 (PhHV-1) se extrajo del siguiente modo: 200  $\mu$ l de la  
 suspensión del cultivo viral se purificaron usando el protocolo "Total NA Serum\_Plasma\_Blood" en un instrumento  
 MagNA Pure LC instrument (Roche, n.º de cat. 12236931001) en combinación con el kit MagNA Pure LC Total  
 10 Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, n.º de cat. 03038505001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.  
 (Brevemente, el material de muestra se introduce en los pocillos del cartucho para muestras, se añade a la muestra  
 tampón de lisis/unión, lo que tiene como resultado una lisis celular completa y la liberación de ácidos nucleicos, se  
 desnaturalizan las nucleasas, se añade proteinasa K a las muestras y las proteínas se digieren, los ácidos nucleicos  
 se unen a la superficie de sílice de las MG añadidas debido a las condiciones de sales caotrópicas, isopropanol y a  
 la elevada fuerza iónica del tampón de lisis/unión. Las MGP con ácidos nucleicos unidos se separan  
 15 magnéticamente de la muestra lisada residual. Las MGO con ácidos nucleicos unidos se lavan repetidamente con  
 tampón de lavado eliminando las sustancias no unidas, como proteínas (nucleasas), membranas celulares,  
 inhibidores de la PCR tales como heparina o hemoglobina y reduciendo la concentración de sales caotrópicas, de  
 nuevo las MGP con ácido nucleico total unido se separan magnéticamente del tampón de lavado que contiene  
 residuos de la muestra, los ácidos nucleicos eluyen a 70 °C de las MGP en los pocillos del cartucho de elución,  
 20 mientras que las MGP quedan retenidas en la punta de reacción y se desechan). El ácido nucleico purificado se  
 eluyó en un volumen de 100  $\mu$ l correspondiente a una concentración de aproximadamente 300.000 copias de  
 virus/ml.

1. PCR del ADN: En primer lugar, se realizó una optimización usando 3.000 copias del PhHV-1 y diferentes  
 25 concentraciones de los dos cebadores (Cebador 1: 5'GGGCGAATCACAGATTGAATCT3'(SEC ID N.º: 1) Cebador 2:  
 5'GCGGTTCCAAACGTACCAA3', (SEC ID N.º: 2)),  $MgCl_2$  y polimerasa TAQ. Tras la elección de variables para PCR  
 óptimas, la temperatura máxima de hibridación ( $T_a$ ) se identificó usando un termociclador de gradiente Eppendorf  
 MasterCycler con los siguientes parámetros de PCR: 42 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, gradiente a 60-72 °C  
 durante 2 minutos y la posterior visualización mediante electroforesis de 7,5  $\mu$ l of de 50  $\mu$ l del producto de PCR en  
 30 un gel de agarosa al 4% a 3 V/cm durante 30 min. Después, se construyeron cebadores con una única mutación  
 puntual (MutPrimer 1 5'GGGCGAATCACAGATTGAGTCT3', (SEC ID N.º: 3), Cebador Mutado 2:  
 5'GCGGTTCCAAACGTATCAA3', (SEC ID N.º: 4), **negrita=mutación**) y se determinó la  $\Delta T_a$  para la mutación.

2. TINA-PCR: Usando las condiciones óptimas para una PCR de ADN clásica como se ha descrito anteriormente se  
 35 describió la  $T_a$  máxima para los cebadores 5'-TINA-ADN (cebador 1 modificado para TINA:  
 5'XGGGCGAATCACAGATTGAATCT3', (SEC ID N.º: 5), Cebador modificado para TINA 2:  
 5'XGCGGTTCCAAACGTACCAA3', (SEC ID N.º: 6), - **X**=TINA). Después, se construyeron cebadores con una única  
 mutación puntual (Cebador mutado 1 modificado para TINA: 5'XGGGCGAATCACAGATTGAGTCT3', (SEC ID N.º:  
 40 7), Cebador mutado modificado para TINA 2: 5'XGCGGTTCCAAACGTATCAA3', (SEC ID N.º: 8), - **X**=TINA,  
**negrita=mutación**) y se determinó la  $\Delta T_a$  para la mutación.

**Resultados:****Condiciones óptimas de PCR:**

45 Mediante intensidad en electroforesis en gel de agarosa se eligió la siguiente combinación de variables para la  
 reacción de PCR del PhHV-1 en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l:  
 Tampón TaqMan A (Applied Biosystems) 1x,  $MgCl_2$  3,5 mM, dNTP 200  $\mu$ M cada uno,  
 50 1U/50  $\mu$ l de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

**Ta y  $\Delta T_a$  :**

55 PCR Dúplex Antiparalelo: La  $T_a$  máxima para los cebadores de ADN fue 66,5 °C y la  $\Delta T_a$  para la mutación fue 1,6  
 °C. La  $T_a$  máxima para los cebadores de TINA-ADN fue 71,6 °C y la  $\Delta T_a$  para la mutación fue 3,5 °C

**Conclusión:**

60 PCR Dúplex Antiparalelo: La incorporación de TINA aumentó la  $T_a$  máxima con 5,1 °C (de 66,5 °C a 71,6 °C) y la  
 $\Delta T_a$  para la mutación única aumentó con 1,9 °C (de 1,6 °C a 3,5 °C).

**Ejemplo 2**

65 **Síntesis de monómeros de ácido nucleico intercalados que contienen un grupo 1H-fenantro[9,10-d]imidazol-  
 2-ilo.**

- La vía sintética hacia los monómeros de ácido nucleico intercalantes ((6a,b) se muestra en la figura 1. Los intermediarios clave 3a,b se sintetizaron a partir de (S)-2-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etanol (1) mediante reacción con 4-hidroxibenzaldehído (2a) o 4-hidroxi-1-naftaldehído (2a) o 4-hidroxi-1-naftaldehído (2b) en condiciones de Mitsunobu 32 (DEAD, THF y Ph3P) con altos rendimientos del 81 % y del 92 %, respectivamente (figura 1). El posterior tratamiento de 3a,b con fenantreno-9,10-diona (4) y acetato amónico en ácido acético glacial caliente dio los monómeros 6a,b. Cuando se inicia a partir de 3a, el producto de la mezcla se separó mediante cromatografía en columna en gel de sílice dando el (S)-4-(4-(1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-il)fenoxi)butano-1,2-diol (6a) desprotegido con un rendimiento del 72 % y una cantidad minoritaria del correspondiente diol (5) todavía protegido con un grupo isopropilideno. Debido al intercambio de protones de imidazol, se observó el ensanchamiento de una línea en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de (5). Esto tuvo como resultado un singlete ancho para los protones vecinos en el anillo fenantreno en C-4 y C-11. El correspondiente compuesto (S)-4-(4-(1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-il)naftalen-1-iloxi)butano-1,2-diol (6b) se aisló completamente desprotegido mediante precipitación con un rendimiento del 80 % sin purificación cromatográfica. El grupo hidroxilo primario de los compuestos 6a,b) se desprotegió mediante reacción con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-Cl) en piridina anhidra a temperatura ambiente en atmósfera de N<sub>2</sub>. La purificación en gel de sílice dio los compuestos protegidos con DMT 7a,b con un rendimiento del 79 % y del 56 %, respectivamente. EL grupo hidroxilo secundario de estos compuestos se fosfitiló durante la noche con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforodiamidita en presencia de tetrazolida de diisopropilamonio como activador en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro dando 8a,b con un rendimiento del 86 % y del 81 %, respectivamente (figura 1).
- La síntesis de monómeros de ácido nucleico intercalados que contienen un grupo 1H-fenantro[9,10-d]imidazol-2-ilo se puede encontrar en Osman (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008).

### Ejemplo 3

#### 25 La síntesis de monómero de ácido nucleico intercalante que contiene una modificación de tipo Sonogashira.

Para la modificación de tipo Sonogashira posintética en fase sólida, se usaron los NO con una inserción de (R)-1-O-(4-yodobencil)glicerol (8) o (R)-1-O-(4-etinilbencil)glicerol (9) en medio y en el extremo 5'. Los soportes de CPG con DMT activo en los NO 8 o 9 se trataron con una mezcla del reactivo de acoplamiento Sonogashira que posee etinilacridina 3 o yodoacridina 2, respectivamente (Figura 2). En ambos casos se obtuvo el mismo producto 10 sobre un soporte sólido. No obstante, se prefiere el procedimiento B porque la preparación del compuesto 9 es fácil. Previamente se ha determinado que el tratamiento doble de los oligonucleótidos unidos a CPG con una mezcla de Sonogashira recién preparada aumentó la eficiencia de acoplamiento.

La síntesis de monómero de ácido nucleico intercalante que contiene una modificación de tipo Sonogashira se trata en Gèci y cols.(Bioconjugate Chem, 2006).

### Ejemplo 4

#### 40 La síntesis de 2- y 4-etinilpirenos y su incorporación en oligonucleótidos.

Los pirenos sustituidos en 2- y 4 no están fácilmente disponibles debido al hecho de que la sustitución electrófila en pireno (8 en la figura 3) está dirigida a la posición 1 rica en electrones. Los derivados de pireno sustituidos en las posiciones 2 y 4 pueden prepararse a partir de 4,5,9,10-tetrahidropireno (9) y 1,2,3,6,7,8-hexahidropireno (10), respectivamente, mediante sustitución electrófila seguida de aromatización. Aunque 10 está disponible comercialmente, es bastante caro. El tetrahidropireno (9) se puede preparar mediante hidrogenólisis de Pd/C del pireno comercial que tiene que purificarse mediante cromatografía en columna en sílice o tiene el azufre eliminado sobre níquel de Raney antes de la reacción. La hidrogenólisis del pireno en el que se ha eliminado el azufre mediante níquel Raney da una mezcla de 9 y 10 (figura 3). La mezcla se puede separar fácilmente mediante cromatografía en óxido de aluminio. Los compuestos 9 y 10 se convierten en los correspondientes 2-etinilpireno (11) y 4-etinilpireno (12) usando sucesivamente acetilación, aromatización, transformación de Vilsmeier-Haack-Arnold y fragmentación de Bodendorf.

Una discusión más exhaustiva de la síntesis de 2- y 4-etinilpirenos en las posiciones para y orto de (R)-1-O-fenilmetilglicerol y su incorporación en oligonucleótidos se puede encontrar en Filichev y cols. (Chem. Eur. J, 2008)

### Listado de secuencias

#### Organización solicitante

- 60 Calle:  
Ciudad:  
Estado:  
País:  
65 Código postal:  
Número de teléfono:

Número de fax :  
Dirección de email:

<110> Nombre de la organización: Quantibact A/S

5

**Solicitante individual**

Calle:  
Ciudad:  
10 Estado:  
País:  
Código postal:  
Número de teléfono:  
Número de fax :  
15 Dirección de email:

<110> Apellido: Lisby  
<110> Nombre: Gorm  
<110> Inicial del segundo nombre:  
20 <110> Sufijo:

**Proyecto de la solicitud**

<120> Título:  
25 <130> Referencia:  
<140> Número de solicitud actual:  
<141> Fecha actual de presentación:

**Secuencia**

30

<213> Nombre del organismo : secuencia artificial  
<400> Hebra pre-secuencia:

gggcgaatca cagattgaat ct 22

35

<212> Tipo : ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la secuencia: Cebador 1  
Descripción de la secuencia:

40

**Secuencia**

<213> Nombre del organismo : secuencia artificial  
45 <400> Hebra pre-secuencia:

gcggttccaa acgtaccaa 19

50

<212> Tipo : ADN  
<211> Longitud: 19  
Nombre de la secuencia: Cebador 2  
Descripción de la secuencia:

**Secuencia**

55 <213> Nombre del organismo : secuencia artificial  
<400> Hebra pre-secuencia:

gggcgaatca cagattgagt ct 22

60

<212> Tipo : ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la secuencia: Cebador mutado 1  
Descripción de la secuencia:

65

**Secuencia**

## ES 2 434 542 T3

<213> Nombre del organismo : secuencia artificial

<400> Hebra pre-secuencia:

5 gcggttcaa acgtatcaa 19

<212> Tipo : ADN

<211> Longitud: 19

Nombre de la secuencia: Cebador mutado 2

10 Descripción de la secuencia:

## REIVINDICACIONES

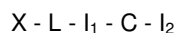
1. Un procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 a. Proporcionar un ácido nucleico plantilla  
 b. Proporcionar un primer oligonucleótido  
 c. Proporcionar una polimerasa  
 d. Proporcionar nucleótidos trifosfatos  
 10 e. Mezclar los componentes de las etapas a-d y proporcionar condiciones, que permitan al cebador hibridarse con la plantilla

-en el que el primer oligonucleótido es un oligonucleótido de una longitud entre 5 y 60 nt, que comprende un monómero TINA de la fórmula Z,

-en el que Z se describe mediante la estructura general:

15



-en la que X es una unidad monomérica estructural que se puede incorporar en la estructura de un oligonucleótido o un análogo nucleotídico, o PNA, o análogos de PNA, L es un engarce,  $I_1$  es un primer intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de las mismas, C es un conjugador opcional e  $I_2$  es un segundo intercalante que comprende un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de co-apilarse con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de las mismas

20

- 25 f. En condiciones que permiten prolongación del cebador, prolongar el primer oligonucleótido hibridado con la plantilla.

2. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Z está localizada en el extremo 5' del oligonucleótido.

30

3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X es una unidad monomérica estructural de un oligonucleótido o un análogo oligonucleotídico, o PNA o análogos de PNA y en el que X comprende alquilendiol, L es un engarce que comprende una cadena alquilo, una cadena oxaalquilo, una cadena azaalquilo, una cadena tialquilo, un grupo carboxamida, un grupo tiocarboxamida, un grupo sulfonamida o combinaciones de los mismos y comprende entre 0-60,  $I_1$  es un sistema anular aromático monocíclico o policíclico seleccionado del grupo que consiste en benceno, naftaleno, azuleno y sistemas anulares heteroaromáticos bicíclicos,  $I_1$  se selecciona del grupo de sistemas anulares aromáticos bicíclicos, sistemas anulares aromáticos tricíclicos, sistemas anulares aromáticos tetracíclicos, sistemas anulares aromáticos pentacíclicos y análogos heteroaromáticos de los mismos y sustituciones de los mismos.

35

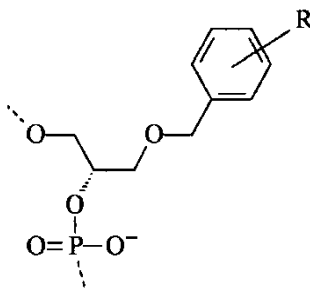
40

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que C es un conjugador seleccionado del grupo de alquilo de 1 a 12 carbonos, alquenilo de 2 a 12 carbonos, alquinilo de 2 a 25 carbonos o diazo o combinaciones de los mismos con una longitud de no más de 25 átomos de carbono y/o nitrógeno.

45

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que  $I_1$  e  $I_2$  están unidos directamente mediante un sistema conjugado.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Z se puede describir mediante la fórmula:



50

-en la que R se selecciona del grupo de ariletinilo.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende adicionalmente unidades monoméricas de nucleótidos modificados seleccionadas del grupo que consiste en unidades de ADN, unidades de ARN, unidades de LNA y unidades 2'-OH-modificadas.

55

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el extremo 3' del oligonucleótido comprende una tira contigua de 3 desoxinucleótidos.
- 5 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende además un sitio de restricción.
- 10 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende además un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, SYBR® Green, 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, Fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, Rojo Texas, Rodamina, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, 6-CarboxiRodamina 6G, Verde Oregón 488, Alexa Flour, Verde Oregón 500 y Verde Oregón 514.
- 15 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido comprende además un pigmento inactivador seleccionado del grupo que consiste en TAMRA<sup>TM</sup>, Black Hole Quencher<sup>TM</sup>, DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, DDQ I, DDQ II y Eclipse Dark Quencher.
- 20 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido o los nucleótidos trifosfatos están marcados con fluorescencia.
- 25 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una fracción de los nucleótidos trifosfatos son didesoxinucleótidos trifosfatos.
- 30 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente las etapas de
- g. Proporcionar un segundo oligonucleótido, que es complementario al primer producto de prolongación de la etapa f
- h. Desnaturalizar el producto de la etapa f
- i. En condiciones que permiten la prolongación del cebador, prolongar el segundo oligonucleótido hibridado con el primer producto de prolongación.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido que comprende un monómero TINA según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-13.



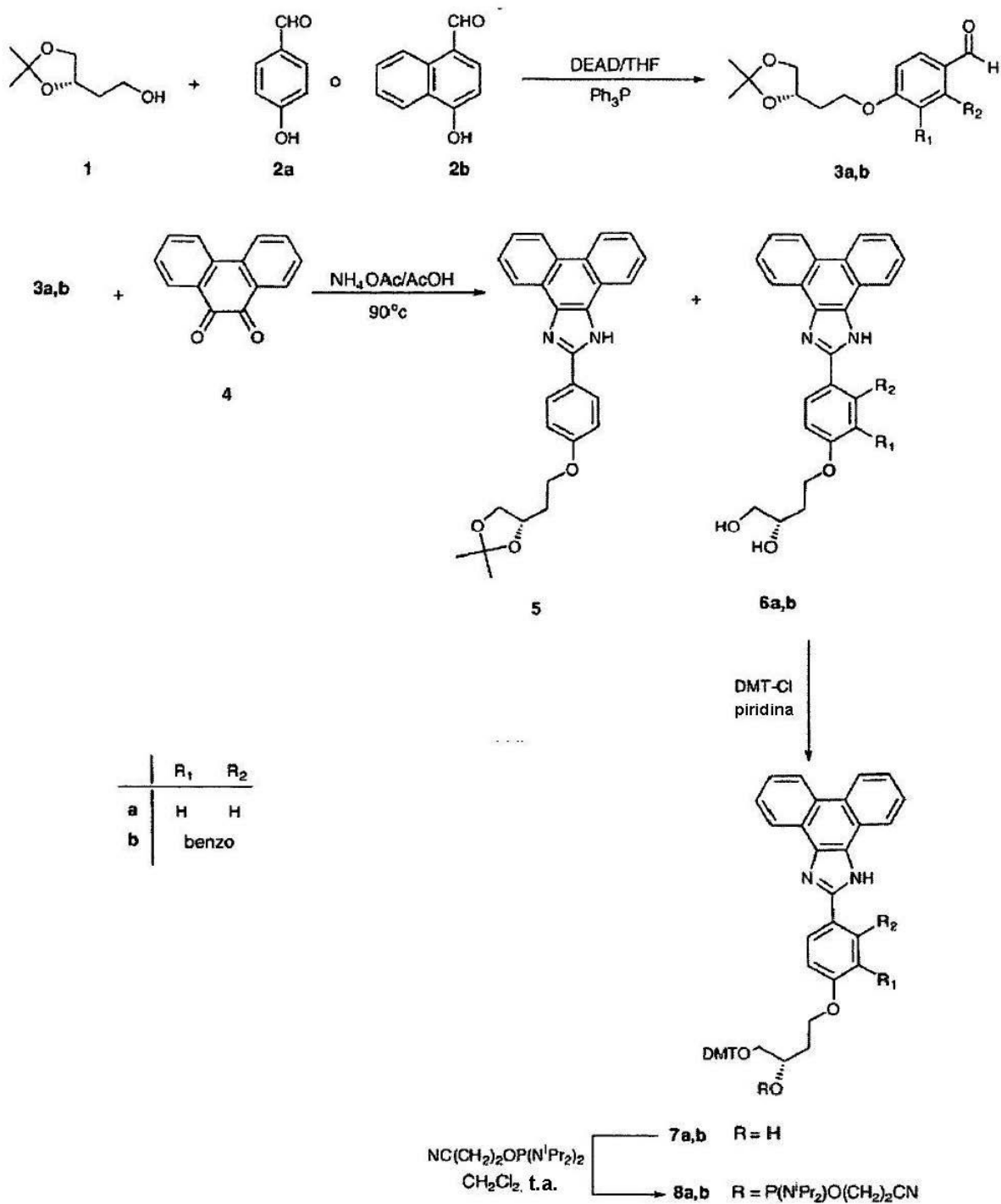


Fig. 1

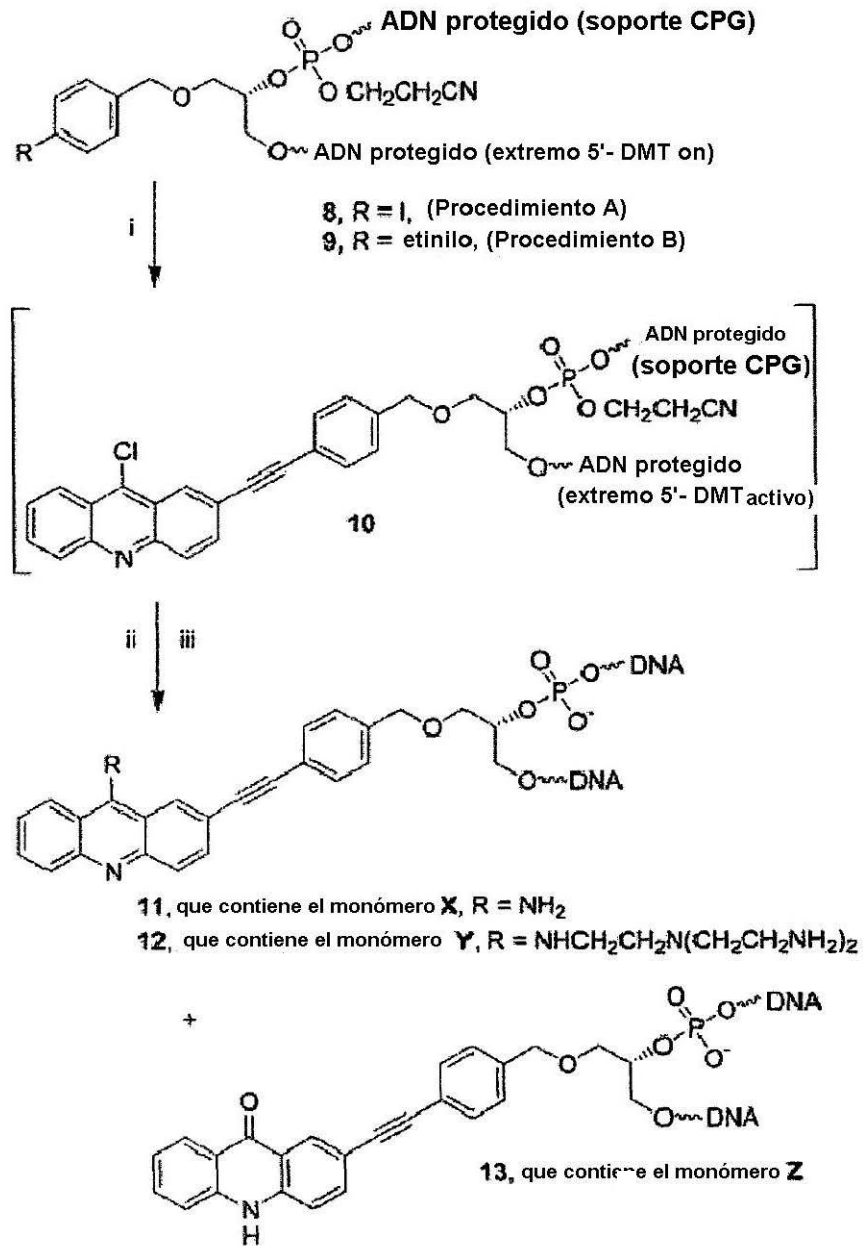


Fig. 2

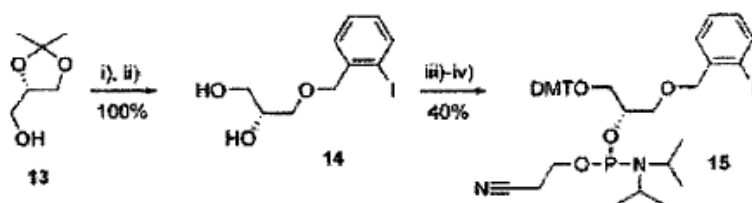
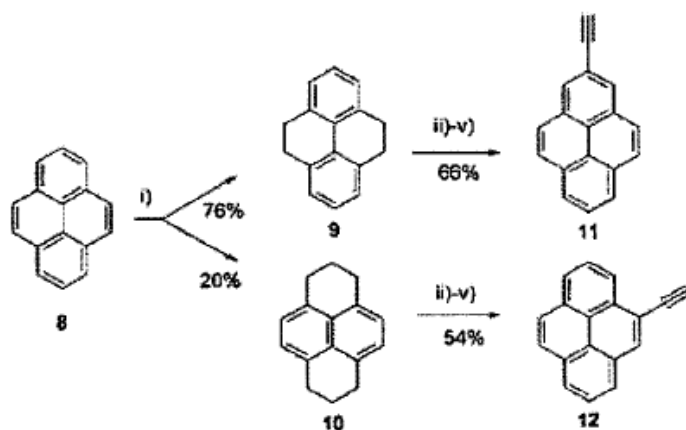


Fig. 3

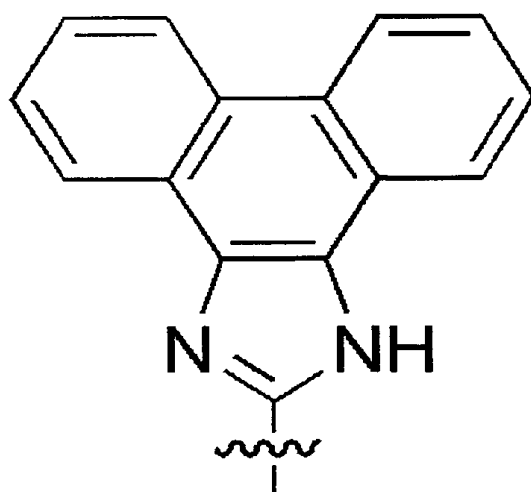


Fig. 4