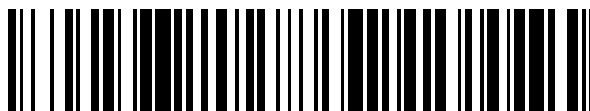


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 343**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2012 PCT/US2012/030467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12129547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 12712197 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2689031**

54 Título: **Análogos de 3-alquinil pirazolopirimidina funcionalizada como bases universales y métodos de uso**

30 Prioridad:

23.03.2011 US 201161466755 P

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

08.05.2017

73 Titular/es:

**ELITECH HOLDING B.V. (100.0%)
Van Rensselaerweg 4
6956 AV Spankeren, NL**

72 Inventor/es:

**VOROBIEV, ALEXEI;
LUKHTANOV, EUGENY, A. y
SCARR, NOAH**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 611 343 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

Análogos de 3-alquilpirazolopirimidina funcionalizada como bases universales y métodos de uso

Antecedentes

Esta invención se refiere a bases universales y a sus usos.

5 Las bases universales son ampliamente utilizadas en cebadores, sondas, hibridación, secuenciación, clonación y detección diagnóstica de objetivos infecciosos. Un análogo de base universal forma pares de bases con cada una de las bases naturales con poca discriminación entre ellas (Loakes et al., 1997; Loakes, 2001). Los requisitos deseables de una base universal incluyen la capacidad de: a) aparearse con todas las bases naturales por igual en un dúplex, a) formar un dúplex que ceba la síntesis de ADN por parte de una polimerasa, c) la incorporación directa del 5'-trifosfato de cada uno de los nucleósidos naturales opuestos a ella cuando son copiados por una polimerasa, (d) ser un sustrato de las polimerasas como el 5'-trifosfato, e) ser reconocida por las enzimas intracelulares, de forma que el ADN que contienen pueda ser clonado (Loakes et al., 1997). Actualmente no se ha demostrado ningún análogo que tenga todas estas características.

15 Se han notificado funciones de la hipoxantina como base de apareamiento universal (Graig, 1966). Nearestneighbor thermodynamics of 2'-deoxyinosine (2-deoxy- β -D-ribofuranosyl-hypoxanthine) apareadas en dúplex de ADN (Watkins y SantaLucia, 2005). La tendencia general de estabilidad fue notificada como I:C > I:A > I:T \approx I:G > I:I. La 2'-desoxiinosina ha encontrado uso como nucleósido universal y es bastante menos no discriminante que los derivados de nitroazol (Bergstrom et al, 1997). Los valores de la T_m varían desde 35,4 °C cuando se aparea con G, hasta 63,2 °C cuando se aparea con C. También se ha divulgado un análogo universal de la 2'-desoxiinosina, la 7-octadiinil-7-deaza-2'-desoxiinosina (Ming et al., 2008). La base nitrogenada de este análogo muestra unas propiedades de unión universales con las cuatro bases naturales en un oligonucleótido de 12-mer con una T_m que varía desde 45 °C para la C hasta 34 °C para la G.

La desestabilización de un dúplex cuando una base natural está sustituida por una base universal es un suceso relativamente habitual y uno de los puntos débiles de la mayoría de las bases universales en la materia.

25 Sumario

La presente divulgación se refiere a 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas funcionalizadas como bases universales y a sus métodos de uso.

30 Los análogos basados en 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona funcionan inesperadamente bien como bases universales. No sólo estabilizan los dúplex sustancialmente más que la hipoxantina opuesta a la A, la C y la T, sino que también son reconocidos como cebadores por parte de las polimerasas, permitiendo una amplificación eficiente. Las 1 H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas sustituidas en la posición 3 con hidroxilalquilino (IPPOH) o con aminoalquilino (IPPNH₂) son preferidas como bases universales.

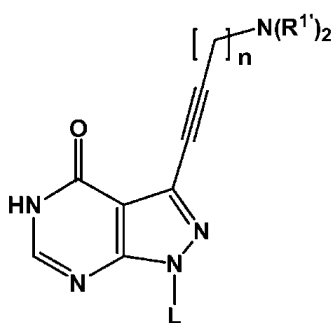
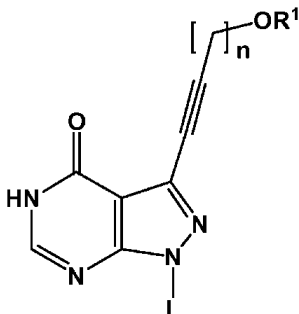
35 Los nucleósidos que contienen estructuras funcionalizadas de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-onas se han divulgado en la Patente de EE.UU. n° 7.045.610, pero no se divulgó ninguna característica de hibridación de los oligonucleótidos que contienen estas bases ni los métodos de síntesis directa.

Los análogos de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona pueden ser incorporados en nuevos cebadores y sondas de ácidos nucleicos. No desestabilizan significativamente los dúplex de ácidos nucleicos, como lo hacen otras bases universales. Como resultado, los nuevos cebadores y sondas de ácidos nucleicos que incorporan los análogos de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona pueden usarse en una diversidad de métodos.

40 En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para la monitorización de la amplificación de los polinucleótidos de un conjunto de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo, que comprende:

(a) proporcionar una mezcla que comprende una muestra que contiene las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, uno o más de un cebador de oligonucleótidos sustancialmente complementario de una porción de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótidos y una sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable de entre 5 y 100 bases, en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable tiene un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de un fosfato de azúcar, un esqueleto de un fosfato de azúcar modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante de los mismos, en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos tiene una secuencia sustancialmente complementaria de una región de sonda de al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene una secuencia complementaria de una

porción adyacente o solapante de la región de sonda de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, y en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos tiene al menos una base de ácidos nucleicos sustituida por un análogo de 3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona; en el que el análogo de 3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona comprende la Fórmula III o la Fórmula IV:



Fórmula III

Fórmula IV

en las que:

R¹ es H;

R^{1'} es H;

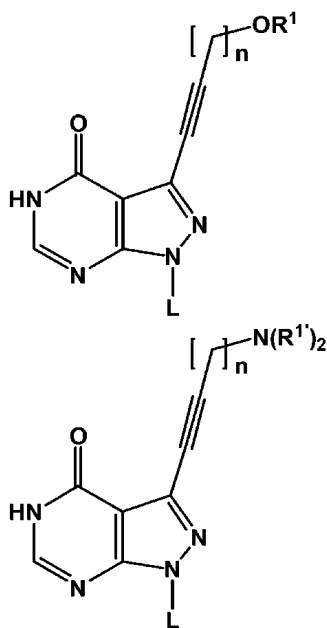
L es un análogo de un esqueleto de azúcar o de azúcar/fosfato, que incluye como pero no se limita a, un esqueleto de ADN, de ARN, de PNA, un ácido nucleico bloqueado, un ADN modificado, un PNA modificado, un ARN modificado, o cualquier combinación de los mismos, y

n es entre 1 y 5; y

(b) incubar la mezcla en unas condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa.

También se proporciona un método para la monitorización de la amplificación de los polinucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, que comprende:

(a) proporcionar una mezcla que comprende una muestra que contiene la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, uno o más cebadores de oligonucleótidos de entre 5 y 50 bases, una sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable de entre 5 y 100 bases, una enzima de polimerización y sustratos de nucleótidos, en el que dichos cebadores de oligonucleótidos tienen un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de un fosfato de azúcar, un esqueleto de un fosfato de azúcar modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante de los mismos, en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene una secuencia sustancialmente complementaria de una porción adyacente o solapante de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene al menos una base de ácidos nucleicos sustituida por un análogo de 3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, en el que el análogo de 3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona comprende la Fórmula III o la Fórmula IV:



Fórmula III

Fórmula IV

en las que:

R¹ es H;

5 R^{1'} es H;

L es un análogo de un esqueleto de azúcar o de azúcar/fosfato, que incluye como pero no se limita a, un esqueleto de ADN, de ARN, de PNA, un ácido nucleico bloqueado, un ADN modificado, un PNA modificado, un ARN modificado, o cualquier combinación de los mismos, y

n es entre 1 y 5; y

10 (b) incubar la mezcla en unas condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa con actividad de 5'-nucleasa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura de las 2'-desoxiinosina y 2-desoxi-β-D-ribofuranosil-3-sustituidas-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas.

15 La Figura 2 muestra los posibles puentes de hidrógeno entre la hipoxantina y las bases de ácidos nucleicos naturales.

La Figura 3 muestra, sin estar ligados a ninguna teoría, los puentes de hidrógeno propuestos entre la 3-(aminobutiril)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y las bases nucleicas normales.

20 La Figura 4 muestra un esquema de reacción para la síntesis de un 5'-fosforamidito de (2-doxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxiuiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona protegido.

La Figura 5 muestra un esquema de reacción para la síntesis de un 3'-fosforamidito de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxiuiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona protegido.

La Figura 6 muestra un esquema de reacción para la síntesis de un 5'-fosforamidito de inosina protegido.

25 La Figura 7 muestra un esquema de reacción para la síntesis de análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(aminoalquiniil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona protegidos.

La Figura 8 muestra un esquema de reacción para la síntesis de análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(metilcarbamoilalquinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

La Figura 9 muestra un esquema de reacción para la síntesis de análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona portadores de sustituyentes de guanidinoalquinilo en la posición 3 de la base nitrogenada.

La Figura 10 muestra un resumen de las temperaturas de fusión (T_m) de los dúplex entre el GT AAGXAGXCAT AAC de 15-mer (SEQ ID NO: 1), en el que X es independientemente 2'-desoxinosina o una 2-desoxi-β-D-ribofuranosil-3-alquinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la presente divulgación, y el complemento que contiene la A, la T, la C o la G opuesta a X.

La Figura 11 muestra una comparación de las T_m de los dúplex entre el 15-mer GTAAGXAGACATAAC (SEQ ID NO: 2), en el que X es independientemente 2'-desoxinosina o una 2-desoxi-β-D-ribofuranosil-3-alquinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la presente divulgación, y el complemento que contiene la A, la T, la C o la G opuesta a X.

La Figura 12 muestra una comparación de las T_m de los dúplex entre el 15-mer GTAAGTAGXCATAAC (SEQ ID NO: 3), en el que X es independientemente 2'-desoxinosina o una 2-desoxi-β-D-ribofuranosil-3-alquinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la presente divulgación, y el complemento que contiene la A, la T, la C o la G opuesta a X.

La Figura 13 muestra una comparación de las T_m de los dúplex entre el GTAAGXAGXCATAAC de 15-mer (SEQ ID NO: 1), en el que X es independientemente 2'-desoxinosina, o una 2-desoxi-β-D-ribofuranosil-3-alquinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la presente divulgación, y el complemento que contiene la A, la T, la C o la G opuesta a X.

La Figura 14 muestra una comparación de los datos de la fusión y la PCR en tiempo real para ensayos con adenovirus mediante el uso de cebadores que contienen los análogos de nucleósidos descritos actualmente.

La Figura 15 muestra una comparación de los datos de la fusión y la PCR en tiempo real para ensayos con adenovirus mediante el uso de cebadores que contienen múltiples incorporaciones de los análogos de nucleósidos descritos actualmente.

La Figura 16 muestra una comparación de los C_t para un ensayo objetivo con *staphylococcus aureus* resistente a la meticilina LGA251 mediante el uso de cebadores sustituidos por cinco nucleótidos de desoxiinosina o por cinco de 3-(aminobutiril)-1h-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5h)-ona.

La Figura 17 muestra que cuando dos T de un cebador están sustituidas por nucleótidos de desoxiinosina o de 3-(aminobutiril)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5h)-ona, que la polimerasa incorpora dos C complementarias de las T.

Descripción detallada

I. Definiciones

Salvo que se establezca de otro modo, los siguientes términos y expresiones tienen los significados proporcionados a continuación:

El término "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia de un ARN o de un ADN objetivo que es parcialmente o completamente complementaria de la hebra madura. La secuencia objetivo puede describirse mediante el uso de las cuatro bases del ADN (A, T, G y C), o de las cuatro bases del ARN (A, U, G y C).

El término "complementario" se refiere a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de bases entre sí. Los pares de bases se forman normalmente mediante puentes de hidrógeno entre unidades de nucleótidos en hebras de polinucleótidos antiparalelas. Las hebras complementarias de polinucleótidos pueden aparear sus bases según Watson-Crick (por ejemplo, A con T, A con U, C con G), o de cualquier otra forma que permita la formación de dúplex, incluyendo el apareamiento de bases por tibeo formado entre U y G. Como saben las personas expertas en la materia, cuando se utiliza ARN en lugar de ADN, la base que se considera complementaria de la adenosina es el uracilo en lugar de la timina. Sin embargo, cuando se indica un U en el contexto de la presente invención, está implicada la capacidad de sustituir una T, salvo que se indique de otro modo. Las bases de inosina modificadas de la solicitud pendiente de tramitación hibridan con unas estabilidades similares a las de los pares de bases normales. Se contempla por lo tanto que el término "complementario" incluya la hibridación de las 3-alquinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas funcionalizadas como bases universales para A, C, T o G.

El término "sustancialmente" complementario se refiere a la capacidad de un oligonucleótido de formar pares de bases específicamente con otro oligonucleótido cuando dicho oligonucleótido puede contener uno o más malapareamientos.

5 El término "dúplex" se refiere a una estructura bicatenaria formada por dos polinucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, incluyendo pares de bases de Watson-Crick y pares de tuteo U-G que permiten una estructura bicatenaria estabilizada entre las hebras de polinucleótidos que son al menos parcialmente complementarias. No es necesario que las hebras de un dúplex sean perfectamente complementarias para la formación del dúplex, es decir, un dúplex puede incluir uno o más malapareamientos de bases. Además, los dúplex pueden formarse entre dos regiones complementarias dentro de una misma hebra (por ejemplo, una horquilla).

10 El término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o a un desoxirribonucleótido o a una forma modificada de los mismos, así como a un análogo de los mismos. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos, así como pirimidinas, por ejemplo, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos. Los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, del azúcar y/o del fosfato, incluyendo, pero no se limitan a, modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminos exocíclicos de citosina, y la sustitución de 5-bromo-uracilo; y modificaciones del azúcar en la posición 2', incluyendo, pero no se limitan a, ribonucleótidos modificados con azúcar en los que el 2'-OH está sustituido por grupo tal como un H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en el que R es una fracción de alquilo. También se entiende que los análogos de nucleótidos incluyen los nucleótidos con bases tales como inosina, queosina, xantina, azúcares tales como 2'-metil ribosa, enlaces fosfodiéster no naturales tales como en etilfosfonatos, fosforotioatos y péptidos.

15 El término "bases modificadas" se refiere a aquellas bases que difieren de las bases naturales (adenina, citosina, guanina, timina y uracilo) mediante la adición o la delección de uno o más grupos funcionales, por diferencias en la estructura del anillo heterocíclico (es decir, la sustitución de un carbono por un heteroátomo, o viceversa), y/o por la adición de una o más estructuras de brazo conector a la base. Los nucleótidos modificados preferidos son aquellos basados en una estructura de pirimidina o en una estructura de purina, siendo las últimas más preferentemente 7 desazapurinas y sus derivados, y pirazolopirimidinas (descritas en el documento PCT WO 01/84958); y también se describen en la Patente de EE.UU. nº 6.127.121. Algunas bases modificadas preferidas son pirimidinas sustituidas en 5 pirazolopirimidinas sustituidas en 3. Algunos ejemplos de bases modificadas preferidas son 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (PPG o Super G®). 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, 1 H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H-6(7H-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-ini)1-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-ini)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-ini)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (Super A®), 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona (Super T), 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina, 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina.

45 Los términos "bases universales" y "bases degenerativas" se refieren a los análogos de las bases naturales que son capaces de formar pares de bases con dos o más bases naturales del ADN o del ARN con poca discriminación entre ellas. Las bases universales y las degenerativas son bien conocidas en la materia y se divulgan en la Patente de EE.UU. nº 7.348.146. Los conjugados de oligonucleótidos que contienen un análogo de inosina de la presente divulgación también pueden comprender una o más bases universales y degenerativas, además de las bases naturales adenina, citosina, guanina, timina y uracilo.

50 El término "nucleótido" también pretende incluir lo que se conoce en la materia como bases universales. A modo de ejemplo, algunas bases universales incluyen, pero no se limitan a, 3-nitropirrol, 5-nitroindol o nebularina. El término "nucleótido" también pretende incluir el fosforamidato de N3' a P5', resultante de la sustitución de un ribosil 3'-oxígeno por un grupo amino. Además, el término nucleótido también incluye aquellas especies que tienen un marcador detectable, tal como, por ejemplo, una fracción radiactiva o fluorescente, o una etiqueta de masa unida al nucleótido.

El término "conector" se refiere a una fracción que se usa para ensamblar varias porciones de la molécula o para unir covalentemente la molécula (o porciones de la misma) sobre un soporte sólido. Adicionalmente, un conector puede incluir porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos.

El término "grupo protector" se refiere a un agrupamiento de átomos que, cuando están unidos a un grupo reactivo de una molécula, enmascaran, reducen o previenen esa reactividad. Algunos ejemplos de grupos protectores pueden encontrarse en T. W. Greene y P. G. Futs, *Protective Groups in Organic Chemistry*, (Wiley, 2ª ed. 1991), Beaucage y Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), y en Harrison y Harrison et al., *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-1996). Algunos grupos protectores de amino representativos incluyen grupos formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), *tert*-butoxicarbonilo (Boc), trimetil sililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC) y similares. Algunos grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen aquellos en los que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, tales como éteres de bencilo y de tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. Estos grupos protectores pueden ser eliminados en unas condiciones que son compatibles con la integridad de un compuesto de interés. Las condiciones de desprotección son bien conocidas en la materia y se describen en las referencias anteriores.

El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal, ramificado o cíclico saturado, o una combinación de radicales hidrocarbonados monovalentes cíclicos y lineales o ramificados saturados que tienen el número de átomos de carbono indicados en el prefijo. Por ejemplo, se entiende que alquilo (C₁-C₈) incluye metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, *tert*-butilo, pentilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo y similares.

Existe una amplia guía en la materia para la selección de los pares de inactivador y de fluoróforo y su unión a los oligonucleótidos (Haugland, 1996; Patentes de EE.UU. nº 3.996.345 y 4.351.760 y similares). Algunos inactivadores preferidos se describen en la Patente de EE.UU. compartida nº 6.727.356. Otros inactivadores incluyen inactivadores de bis azo (Patente de EE.UU. nº 6.790.945) y los colorantes de Biosearch Technologies, Inc. (proporcionados como los inactivadores Black Hole™: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcilo, TAMRA y carboxitrametil rodamina.

Se han descrito conjugados de oligonucleótidos aglutinantes de surco menor (o "sondas") (véase la Patente de EE.UU. nº 5.801.155 y la Patente de EE.UU. nº 6.312.894). Estos conjugados forman dúplex hiperestabilizados con un ADN complementario. En particular, la especificidad de secuencia de las sondas aglutinantes de surco menor cortas es excelente para aplicaciones a alta temperatura, tales como una PCR. Las sondas/conjugados de la presente divulgación también pueden tener un aglutinante de surco menor unido covalentemente. En la bibliografía se ha descrito una variedad de aglutinantes de surco menor adecuados. Véase, por ejemplo, Kutayavin, et al., Patente de EE.UU. nº 5.801.155; Wemmer, D. E. y Dervan P. B., *Current Opinon in Structural Biology*, 7: 355-361 (1997); Walker, W. L., Kopka, J. L. y Goodsell, D. S., *Biopolimers*, 44: 323-334 (1997); Zimmer, C & Wahnert, U. *Prog. Biophys. Molec. Bio.* 47: 31-112 (1986) y Reddy, B. S. P., Dondhi, S. M., y Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84: 1-111 (1999).

Algunos métodos adecuados para la unión de los aglutinantes de surco menor (así como de grupos indicadores, tales como fluoróforos e inactivadores) a través de conectores a oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº RE 38.416; 5.512.677; 5.419.966; 5.696.251; 5.585.481; 5.942.610 y 5.736.626.

Una enzima que procesa un nucleótido monofosfato, un nucleótido difosfato o un nucleótido trifosfato es una enzima que utiliza un nucleótido monofosfato, un nucleótido difosfato o un nucleótido trifosfato como uno de sus sustratos. Una enzima que procesa un ácido nucleico de un nucleótido monofosfato, un nucleótido difosfato o un nucleótido trifosfato cataliza las modificaciones a ácidos nucleicos o a intermedios de ácidos nucleicos mediante el uso de cualquiera de un nucleótido monofosfato, de un nucleótido difosfato o de un nucleótido trifosfato como uno de los sustratos. Algunas enzimas de nucleótidos monofosfato, de nucleótidos difosfato o de nucleótidos trifosfato incluyen, pero no se limitan a, enzimas de extensión de cebador, polimerasas de ADN, polimerasas de ARN, enzimas de restricción, enzimas de corte y empalme, enzimas de reparación o enzimas de ligación.

La síntesis de los análogos de pirazolopirimidin-monofosfato y de pirazolopirimidin-trifosfato se ha divulgado en la Patente de EE.UU. nº RE 38.416.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales en química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácidos nucleicos, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante, secuenciación, secuenciación de siguiente generación y campos relacionados que están en la pericia de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lee H et al., *Methods Mol. Biol.* 855: 155-74 (2012); Ausubel, et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press (1991).

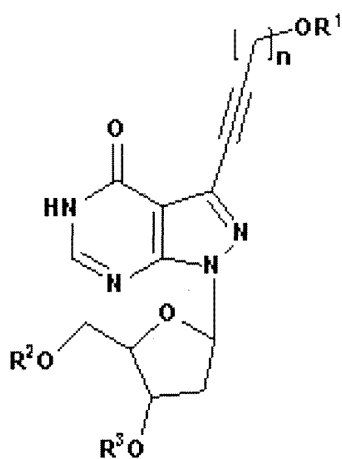
Los procedimientos de amplificación son aquellos en los que se generan muchas copias de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, habitualmente de una forma exponencial, mediante reacciones secuenciales de polimerización

y/o de ligación. Además de las reacciones de amplificación más tradicionales analizadas a continuación, la presente invención es útil en amplificaciones que implican uniones de tres vías (véase el documento WO 99/37085), amplificaciones de la señal (véase Capaldi, et al., Nuc. Acids Res., 28: E21 (2000)), polimerasas T7, transcriptasa inversa, RNasa H, RT-PCR, círculos rodantes, escindasa y similares. Se han revisado los métodos de amplificación isotérmica (Niemz, A. et al Trends Biotechnol., 29: 240-50 (2011)). El término "cebadores de oligonucleótidos adyacentes a una región de sonda" se refiere a cuando 0 o una o más bases separan el cebador y la sonda. El término "solapamiento con dicha región de sonda" se define según se divulga en la Patente de EE.UU. n° 7.319.022. El término "Ct" se refiere al número de ciclos de la PCR fraccionaria, en los que la fluorescencia del indicador es mayor que el umbral.

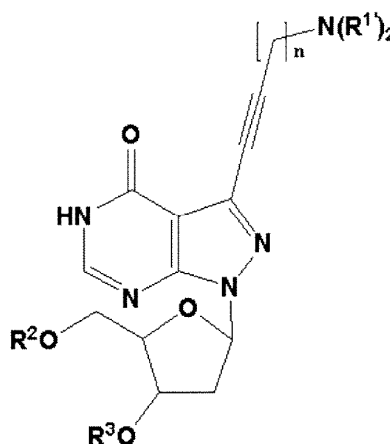
Muchas reacciones de amplificación, tales como la PCR, utilizan reacciones de polimerización reiterativas dependientes de un cebador. Un cebador es un ácido nucleico que es capaz de hibridar con un segundo ácido nucleico de molde, y que, una vez hibridado, es susceptible de ser extendido por una enzima de polimerización (en presencia de sustratos de nucleótidos), mediante el uso del segundo ácido nucleico como molde. Algunas enzimas de polimerización incluyen, pero no se limitan a, polimerasas de ADN y de ARN y transcriptasas inversas, etc. Las condiciones favorables para una polimerización por parte de diferentes enzimas de polimerización son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel. et al., *supra*; Innis et al., *supra*. Generalmente, con objeto de que sea extensible por una enzima de polimerización, un cebador debe tener un extremo 3' desbloqueado, preferentemente un grupo hidroxilo libre en 3'. El producto de una reacción de amplificación es un cebador extendido, en la que el cebador ha sido extendido por una enzima de polimerización.

II. Descripción

Los presentes análogos de inosina incluyen los compuestos monoméricos de Fórmula I y II:



Fórmula I



Fórmula II

en las que:

R¹ es H o un grupo protector;

R¹ es H, alquilo, -(C=NR⁴)N(R⁴)₂, -(C=O)N(R⁴)₂ o un grupo protector;

R² es H, un grupo fosfato, un grupo polifosfato, un grupo fosfato activado, un grupo protector, un fosforamidito o un soporte sólido;

R³ es H, un grupo protector o un fosforamidito;

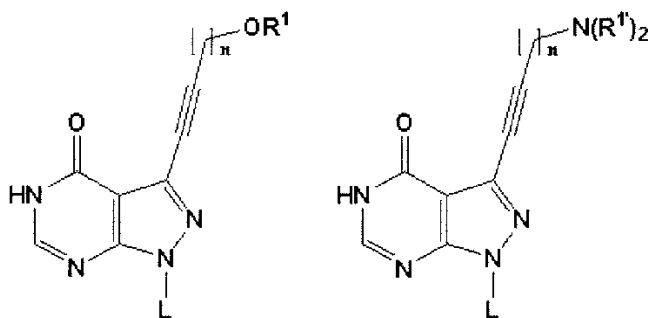
R⁴ es H o un alquilo; y

n es entre 1 y 5.

En ciertas realizaciones, tales como cuando el R² de las fórmulas anteriores es un grupo polifosfato, este análogo de polifosfato resultante puede ser un difosfato o un trifosfato. Estos análogos de polifosfato pueden ser usados en

reacciones de extensión de cebadores catalizadas por enzimas.

En ciertas realizaciones, los presentes análogos de inosina también son útiles en la síntesis de oligómeros y de intermedios de oligonucleótidos. En particular, los análogos de inosina también incluyen compuestos de las siguientes Fórmulas III y IV:



Fórmula III

Fórmula IV

en las que:

R^1 es H o un grupo protector;

R^1 es H, alquilo, $-(C=NR^4)N(R^4)_2$, $-(C=O)N(R^4)_2$ o un grupo protector; y

L es un análogo de un esqueleto de azúcar o de azúcar/fosfato, que incluye, como pero no se limita a, un esqueleto de ADN, de ARN, de PNA, un ácido nucleico bloqueado, un ADN modificado, un PNA modificado, un ARN modificado, o cualquier combinación de los mismos.

En las realizaciones preferidas, los oligonucleótidos modificados que incorporan los presentes análogos de inosinas están formados por fracciones glicosídicas, preferentemente de 2-desoxiribofuranósidos en los que todos los enlaces internucleosídicos son los enlaces de fosfodiéster naturales. Sin embargo, en realizaciones alternativas, los grupos de 2-desoxi- β -D-ribofuranosa están sustituidos por otros azúcares, por ejemplo, β -D-ribofuranosa. Además, puede estar presente la β -D-ribofuranosa, en la que el 2-OH de la fracción de ribosa está alquilado con un grupo alquilo C_{1-6} (2-(O--alquilo C_{1-6}) ribosa) o con un grupo alqueno C_{2-6} (2-(O--alqueno C_{2-6}) ribosa) o está sustituido por un grupo fluoro (2-fluororribosa). Algunos azúcares formadores de oligómeros relacionados útiles en la presente invención son aquellos que están "bloqueados", es decir, que contienen un puente de metileno entre el C-4' y un átomo de oxígeno en el C-2'. También pueden usarse otras fracciones de azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido, y son conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero no se limitan a, α -D-arabinofuranósidos, α -2'-desoxirribofuranósidos o 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen α -D-arabinofuranósidos pueden ser preparados según se describe en la Patente de EE.UU. nº 5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos se describen en Chen et al. 1995. Synthetic procedures for locked nucleic acids (Singh et al, 1998; Wengel J., 1998) y se han descrito oligonucleótidos que contienen 2'-halógeno-2'-desoxirribofuranósidos (Palissa et al., 1987). El esqueleto de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos en el presente documento también puede ser modificado, de forma que los oligonucleótidos contengan enlaces de fosforotioato y/o de metilfosfonatos y/o de fosforoamidatos (Chen et al., 1995). Las combinaciones de enlaces de oligonucleótidos también están en el ámbito de la presente invención. Otras modificaciones adicionales del esqueleto son conocidas por los expertos en la materia.

En otro grupo de realizaciones, los análogos de inosina descritos en el presente documento son incorporados en PNA y en quimeras de ADN/PNA para equilibrar las T_m y proporcionar unos oligonucleótidos modificados que tienen unas propiedades de hibridación mejoradas. Se han usado varias formas modificadas de ADN y de análogos de ADN en un intento de superar algunos de los inconvenientes del uso de moléculas de ADN, como sondas y cebadores. Entre estos están los ácidos nucleicos peptídicos ("PNA"), también conocidos como ácidos nucleicos de poliamida (Nielsen et al. 1991). Los PNA contienen unidades de bases heterocíclicas naturales del ARN y del ADN que están unidas por un esqueleto de poliamida en lugar del esqueleto de azúcar-fosfato característico del ADN y del ARN. Los PNA son capaces de hibridar con secuencias objetivo complementarias de ADN y de ARN, y de hecho, hibridan más fuertemente que la correspondiente sonda de ácidos nucleicos. La síntesis de oligómeros de PNA y de los monómeros reactivos usados en la síntesis de los oligómeros de PNA se ha descrito en las Patentes de EE.UU. nº 5.539.082; 5.714.331; 5.773.571; 5.736.336 y 5.766.855. Se han resumido metodologías alternativas para la síntesis de PNA y de quimeras de ADN/PNA, y de monómeros para la síntesis de PNA (Uhlmann et al. 1998). Consecuentemente, el uso de cualquier combinación de bases normales, análogos de bases de 3-alquil-1H-

pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, bases universales y aglutinantes de surco menor para equilibrar la T_m de un PNA o de una quimera de ADN/PNA está en el ámbito de esta invención. Los métodos sintéticos necesarios para la síntesis de unidades monoméricas de bases modificadas necesarias para la síntesis del PNA y de las quimeras de PNA/ADN están disponibles en esta solicitud y en Uhlmann et al. 1998.

5 Algunos ejemplos de compuestos de la invención se muestran en la Figura 1. La Figura 2 ilustra los puentes de hidrógeno que se forman entre la hipoxantina y las bases de los ácidos nucleicos naturales. Según se indica, y sin estar ligados a ninguna teoría, los expertos en la materia contemplan la hipoxantina como formadora de dos puentes de hidrógeno con las bases normales de los ácidos nucleicos en una formación en dúplex. La Figura 3 ilustra, de nuevo sin estar ligados a ninguna teoría, la formación propuesta de los puentes de hidrógeno con NH_2Bu -PPI con bases naturales en un dúplex.

Los presentes análogos basados en 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona funcionan inesperadamente bien como bases universales. No sólo estabilizan los dúplex sustancialmente más que la hipoxantina opuesta a la A, la C y la T, sino que también son reconocidos como cebadores por parte de las polimerasas, permitiendo una amplificación eficiente. En el caso de la G, la unión es similar a la que se observa con la inosina.

15 Las inesperadas propiedades de los análogos basados en 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la presente invención puede ser aplicadas esencialmente a cualquier metodología que se base en la hibridación de ácidos nucleicos y/o que implique la participación de enzimas de procesamiento de ácidos nucleicos. El término enzima de procesamiento de ácidos nucleicos se refiere a cualquier enzima que esté implicada en una transformación química o en una manipulación física de los ácidos nucleicos o de sus componentes. Consecuentemente, los análogos basados en 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona son útiles en todas las técnicas basadas en hibridación, incluyendo, pero no se limitan a, la detección de más de un objetivo, la amplificación de más de un objetivo, el uso de matrices, el uso de enzimas de procesamiento, la conversión de intermedios, la secuenciación y otros.

La presente divulgación se refiere, en un aspecto, a un método para la monitorización continua de la amplificación de los polinucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, comprendiendo el método:

- 25 (a) la combinación de una muestra que contiene dicho ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores de oligonucleótidos adyacentes a, o solapantes con, dicha región de sonda de la secuencia objetivo, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótidos y un oligómero de ácido nucleico de entre 5 y 100 bases de longitud, en el que dicho polímero de ácido nucleico tiene un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de azúcar fosfato, un esqueleto de azúcar fosfato modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante de los mismos usada en la preparación de un ácido nucleico; y
- 30 al menos una base de un ácido nucleico que está sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y la porción del oligonucleótido tiene una secuencia complementaria de una porción de la secuencia objetivo que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;
- 35 (b) la incubación de la mezcla en unas condiciones favorables para la polimerización; y
- (c) la monitorización de forma continua de la amplificación mediante la monitorización de la fluorescencia producida tras la hibridación del conjugado con el objetivo amplificado.

En algunas realizaciones, al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene una secuencia complementaria de una porción adyacente de la región de sonda de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

40 En algunas realizaciones, el método para la monitorización continua de la amplificación del polinucleótido de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo incluye métodos en los que cada base representa independientemente una base de un ácido nucleico, al menos un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, y al menos una base modificada.

En otras realizaciones, el oligómero del ácido nucleico es un conjugado que comprende un ligando aglutinante de surco menor.

45 Otra realización se refiere a un método para la monitorización continua de la amplificación del polinucleótido de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, comprendiendo el método uno o más cebadores de oligonucleótidos adyacentes a, o solapantes con, dicha región de sonda de la secuencia objetivo, en el que dicho uno o más cebadores de oligonucleótidos es un oligonucleótido es entre 5 y 50 bases de longitud, en el que dicho polímero de ácido nucleico tiene un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de azúcar fosfato, un esqueleto de azúcar fosfato quimérico modificado, un esqueleto de ácido nucleico quimérico bloqueado, un esqueleto peptídico quimérico o una variante de los mismos usada en la amplificación del ácido nucleico; y al menos una base de un ácido nucleico base está sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y la porción del oligonucleótido tiene una secuencia complementaria de una porción de la secuencia objetivo que se está amplificando.

Otro método para la extensión con cebador de los ácidos nucleicos objetivo comprende uno o más cebadores complementarios de la secuencia objetivo, en el que cada base del ácido nucleico representa independientemente una base de un ácido nucleico, al menos un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y al menos una base modificada.

- 5 En realizaciones adicionales, el cebador también contiene un ligando aglutinante de surco menor y un marcaje.

Un método alternativo para la monitorización continua de la amplificación del polinucleótido de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo comprende uno o más cebadores de oligonucleótidos adyacentes a, o solapantes con, dicha región de sonda de la secuencia objetivo, en el que cada base del ácido nucleico representa independientemente una base de un ácido nucleico, al menos un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y al menos una base modificada.

En otra realización se detectan múltiples ácidos nucleicos objetivo en una reacción de amplificación de polimerasa con uno o más cebadores y más de una sonda, en la que cada sonda está marcada de forma única y en la que al menos uno de dichos cebadores o sonda contiene al menos una base normal sustituida por un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

- 15 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para distinguir entre polinucleótidos objetivo naturales, mutantes y heterocigóticos, comprendiendo el método:

a) la medición de la emisión de fluorescencia en función de la temperatura para determinar un primer perfil de fusión de una primera sonda que se funde a partir de un primer polinucleótido amplificado y un segundo perfil de fusión de una segunda sonda que se funde a partir de un segundo polinucleótido amplificado, en el que cada sonda contiene independientemente cero o uno o más análogos de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona; y

(b) la comparación de la primera curva de fusión con la segunda curva de fusión.

En otras realizaciones, la muestra se pone en contacto además con un conjunto de cebadores en condiciones de amplificación y en las que al menos uno de los cebadores contiene al menos un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona. En otras realizaciones al menos uno de los cebadores también puede contener una base modificada seleccionada entre el grupo divulgado anteriormente.

En otras realizaciones, se proporciona un método para la monitorización continua de la amplificación de los polinucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo que tiene al menos dos polimorfismos de nucleótido individual, en el que se quiere distinguir un primer polimorfismo de nucleótido individual y no se distingue un segundo polimorfismo de nucleótido individual, estando cada uno de dichos polimorfismos en una región de sonda de dicho ácido nucleico objetivo, que comprende:

(a) la combinación de una muestra que contiene dicho ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores de oligonucleótidos adyacentes a, o solapantes con, dicha región de sonda de la secuencia objetivo, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótidos y un conjugado de un oligonucleótido que comprende un fluoróforo, en el que el conjugado de un oligonucleótido tiene un componente de esqueleto de ácidos nucleicos seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de azúcar fosfato, un esqueleto de azúcar fosfato modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado y un esqueleto peptídico,

en el que el conjugado de un oligonucleótido contiene una base de un ácido nucleico sustituida por un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona en el sitio complementario de dicho segundo polimorfismo de nucleótido individual, y en el que el conjugado de un oligonucleótido tiene una secuencia complementaria de una porción de la secuencia objetivo que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

(b) la incubación de la mezcla en condiciones favorables para la polimerización; y

(c) la monitorización de forma continua de la amplificación mediante la monitorización de la fluorescencia producida tras la hibridación del conjugado con el objetivo amplificado.

- 45 En otras realizaciones la polimerización está catalizada por una enzima de polimerización en condiciones isotérmicas.

En ciertas realizaciones, un nucleótido que comprende un análogo de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona según se divulga en el presente documento es incorporado por una enzima de procesamiento de nucleótidos en un ácido nucleico, en el que dicho ácido nucleico tiene, como resultado, unas propiedades de hibridación mejoradas cuando se hibrida con un segundo ácido nucleico. Los análogos de 3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona de la invención incorporados tienen unas propiedades universales que incluyen una mejor hibridación (T_m) particularmente con A, C y T. Aunque los presentes análogos hibridarán con G, normalmente no muestran ninguna mejora en comparación con la inosina.

También se proporcionan micromatrices de oligómeros en las que en la matriz está presente en al menos uno de los oligómeros descritos en el presente documento. Por lo tanto, los oligómeros modificados que comprenden análogos de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona según se divulgan en el presente documento, son útiles en técnicas que incluyen, pero no se limitan a, hibridación, extensión con cebador, ensayos con sondas hidrolizables, métodos de amplificación (por ejemplo, PCR, SSSR, NASBA, SDA, LAMP), discriminación del mal apareamiento de nucleótidos individuales, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelos, análisis de la secuencia de nucleótidos, hibridación con matrices de oligonucleótidos, hibridación *in situ* y técnicas relacionadas. Los oligómeros divulgados en el presente documento pueden usarse como oligómeros inmovilizados en matrices de oligómeros tales como las descritas, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. n° 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752 y en las publicaciones PCT WO 92/10588 y WO 96/17957.

En otras realizaciones, los cebadores de secuenciación contienen uno o más análogos de bases de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

Consecuentemente, en otro aspecto de la invención, se proporcionan kits que contienen sondas y/o conjugados como se ha descrito anteriormente, junto con cebadores para las reacciones de amplificación, en los que los cebadores contienen uno o más análogos de bases de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, más preferentemente, entre una y diez bases de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona por cebador.

III. Síntesis

Síntesis de las (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas.

La síntesis del 5'-fosforamidito de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxibuinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-on **8** protegido se muestra en el Esquema de Reacción 1, en la Figura 4. En resumen, el compuesto **1** (documento US 6.949.367) se convirtió en la 3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina **2** mediante una reacción con metóxido de sodio en metanol. Después, se protegió el grupo 5'-hidroxilo con un grupo *tert*-butildifenilsililo mediante una reacción con TBDPS en piridina para producir **3**. El 3'-hidroxilo se protegió después con un grupo dimetoxitritilo mediante una reacción de cloruro de dimetoxitritilo en piridina anhidra para producir **4**. El tratamiento de **4** con fluoruro de tetrabutilamonio en THF eliminó el grupo *tert*-butildifenilsililo para producir **5**, que se convirtió en el análogo de pirazolopirimidin-inosina **6** mediante el tratamiento con una solución de hidróxido de sodio acuoso-THF/metanol. El compuesto **6** se convirtió en el análogo de 3-(4-acetoxibutinilo) **7** mediante la reacción con acetato de but-3-inilo en presencia de CuI y de Pd(PPh₃)₄ en DMF anhidra. El fosforamidito protegido **8** se sintetizó mediante la reacción de **7** con 2-ciano-N,N,N',N'-tetraisopropilfordiamidito y tetrazoluro de diisopropilamonio en CH₂Cl₂.

La síntesis del 3'-fosforamidito de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxibuinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-on protegido **12** se muestra en el Esquema de Reacción 2, en la Figura 5.

El 3'-hidroxilo de la 3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina **2** se protegió con un grupo dimetoxitritilo mediante la reacción de cloruro de dimetoxitritilo en piridina anhidra para producir **9**. El compuesto **9** se convirtió en el análogo de pirazolopirimidin-inosina **10** mediante el tratamiento con una solución de hidróxido de sodio acuoso-THF/metanol, que después se convirtió en el análogo de 3-(4-acetoxibutinilo) **11** mediante la reacción con acetato de but-3-inilo en presencia de CuI y de Pd(PPh₃)₄ en DMF anhidra. El fosforamidito protegido **12** se sintetizó mediante la reacción de **11** con 2-ciano-N,N,N',N'-tetraisopropilfordiamidito y tetrazoluro de diisopropilamonio en CH₂Cl₂.

La síntesis del 5'-fosforamidito de inosina protegido **16** se muestra en el Esquema de Reacción 3, en la Figura 6.

El 5'-hidroxilo de la 2'-desoxiinosina (**13**) se bloqueó en primer lugar con un grupo *tert*-butildifenilsililo, y el 3'-hidroxilo se bloqueó con un grupo DMT, como se ha descrito anteriormente, para producir **14**. Después, el grupo sililo de **14** fue eliminado mediante la reacción con fluoruro de tetrabutilamonio en THF para dar el análogo de DMT **15**, que después se convirtió en el fosforamidito **16** como se ha descrito anteriormente.

La síntesis de los análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(aminoalquil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona protegidos análogos se muestra en el Esquema de Reacción 4, en la Figura 7.

Los compuestos **17**, **19**, **21** y **23** se prepararon mediante un acoplamiento de Sonogashira del compuesto **10** con trifluoroacetamido (n = 1 y 2) o con ftalimidoalquilos (n = 3 y 4). La siguiente reacción con tetraisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo proporcionó los fosforamiditos finales **18**, **20**, **22** y **24**.

La síntesis de los análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(metilcarbamoiloalquil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona se muestra en el Esquema de Reacción 5, en la Figura 8.

Las aminas **25**, **26** y **27** se prepararon a partir de los intermedios de amina protegida **19**, **21** y **23** mediante un tratamiento con una mezcla de metilamina acuosa e hidróxido de amonio concentrado a 55 °C bajo presión. Las

aminas libres se convirtieron en los derivados metilcarbomoilados **28**, **29** y **30** mediante una reacción con N-metilcarbomato de N-succinimidilo. Los intermedios 3'-hidroxi resultantes se hicieron reaccionar con tetraisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo para proporcionar los fosforamiditos finales **31**, **32** y **23**.

- 5 El Esquema de Reacción 6, en la Figura 9, muestra la preparación de los análogos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona portadores de los sustituyentes de guanidinoalquinilo en la posición 3 de la base nitrogenada.

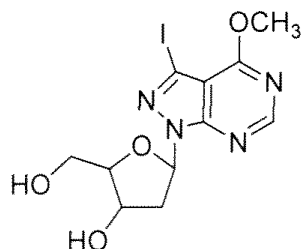
Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención actualmente reivindicada.

Ejemplo 1. Síntesis

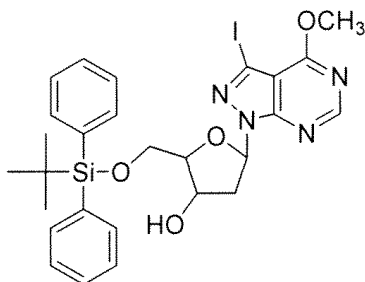
- 10 Este ejemplo ilustra la síntesis del 5'-fosforamidito de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxi-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona protegido **8**.

1 -(2-Deoxi-β-D-ribofuranosil)-3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (**2**):



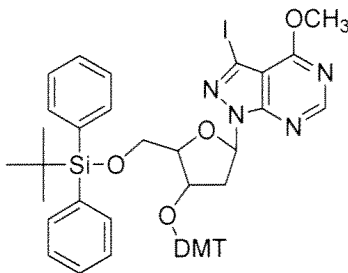
- 15 En un matraz de 500 ml se combinaron **1** (documento US 6949367) (5,6 g, 8,5 mmol) y una solución de metóxido de sodio en metanol (56 ml, 25 % de NaOCH₃) y a la suspensión se le aplicaron ultrasonidos durante 25 minutos para obtener una suspensión brumosa. El análisis mediante HPLC mostró la conversión completa de **1** a **2** y el matraz se enfrió, después se añadió ácido acético glacial (15,5 ml) y la mezcla se concentró en un rotavapor equipado con una trampa de lejía. El sólido resultante se disolvió en 300 ml de acetato de etilo y se extrajo con 150 ml de agua hasta que se disolvieron los sólidos. La capa orgánica se lavó con salmuera (3 x 50 ml) y los extractos acuosos agrupados se retrolavaron con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron y se suspendieron en hexanos durante 14 h, se filtraron y se lavaron con hexanos para obtener **2** en forma de un sólido amorfo de color blanquecino (3,16 g, 95 % de rendimiento).
- 20

1-(5-(*tert*-Butildifenilsilil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (**3**):



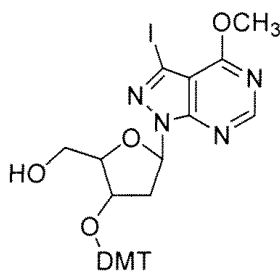
- 25 En un matraz de 500 ml se suspendió **2** (3,6 g, 9,2 mmol) en piridina anhidra (60 ml), después se añadió *tert*-butildifenilclorosilano (2,78 g, 10 mmol) y la mezcla se agitó durante 72 horas. La suspensión se concentró y se particionó entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 % y salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró hasta una espuma de color blanco. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida con un 25-33 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **3** en forma de una espuma de color blanco (5,2 g, 90 % de rendimiento).
- 30

1-(5-(*tert*-Butildifenilsilil)-3-dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (**4**):



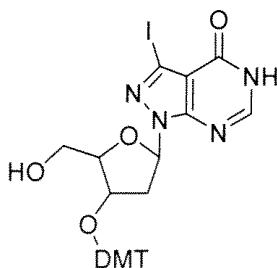
5 En un matraz de 500 ml se suspendió **3** (5,15 g, 8,16 mmol) en piridina anhidra (60 ml), después se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (3,6 g, 10,6 mmol) y la mezcla se agitó durante 14 horas. La reacción se valoró con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo adicional hasta que se completó, después la mezcla se concentró y se particionó entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 % y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró para obtener una espuma de color amarillo brillante. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida con un 10-25 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **4** en forma de una espuma de color blanco (8,6 g, 113 % de rendimiento).

10 1-(3-Dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (**5**):



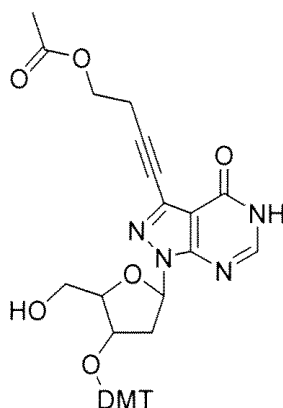
15 En un matraz de 500 ml se disolvió **4** (7,5 g, 8,0 mmol) en fluoruro de tetrabutilamonio en THF (16 ml, 1 M) y se diluyó con 20 ml de THF. La reacción se agitó durante 1 h y se concentró hasta un sólido. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 10-60 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **5** en forma de una espuma de color blanco (5,59 g, 100 % de rendimiento).

1-(3-Dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (**6**):



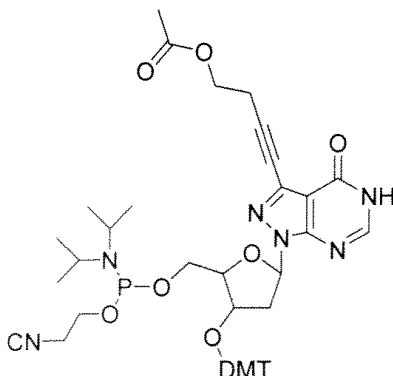
20 En un matraz de 500 ml se disolvió **5** (7,5 g, 8,0 mmol) en THF (27 ml), después se añadió metanol (30 ml) y un 50 % de NaOH (ac.) (6 ml). La solución se calentó a 40-45 °C durante 6 horas, se concentró hasta un sólido y se particionó entre acetato de etilo y ácido cítrico al 10 %. La capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado (ac.) y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró hasta una espuma de color rosado. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 20-100 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **6** en forma de una espuma de color blanco (5,15 g, 94 % de rendimiento).

1-(3-Dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(4-acetoxibut-1-in-1-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (7):



5 En un matraz de 500 ml se disolvió **6** (5,04 g, 7,4 mmol) en DMF anhidra (40 ml), después se añadió trietilamina (3 g, 30 mmol), acetato de but-3-inilo (1,0 g, 8,9 mmol), y la solución se desgasificó con argón. Después, el matraz se cargó con CuI (282 mg, 1,48 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (855 mg, 740 μmol) y la reacción se agitó durante 14 h en una atmósfera de argón. La solución de color naranja se concentró hasta un aceite de color pardo y se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 75-100 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **7** en forma de una espuma de color amarillo pálido (3,7 g, 75 % de rendimiento).

10 1-(5-(2-Cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidito-3-dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(4-acetoxibut-1-in-1-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (8):

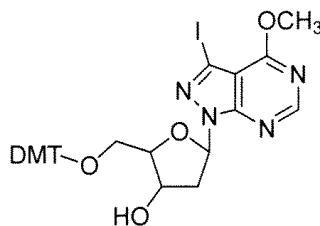


15 En un matraz de 500 ml se disolvió **7** (3,6 g, 5,4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (75 ml), después se añadió tetrazoluro de diisopropilammonio (1,0 g, 5,9 mmol) y N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo (2,55 ml, 8,1 mmol) y la reacción se valoró con reactivo de fosforamidito adicional hasta que se completó. La suspensión se concentró y se disolvió en acetato de etilo, se lavó con un 5 % de NaHCO₃ (ac.) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta un aceite. El producto en bruto se disolvió en acetato de etilo anhidro y se precipitó con pentano anhidro; se repitió la precipitación y la goma resultante se secó para obtener **8** en forma de un sólido amorfo (4,25 g, 91 % de rendimiento).

Ejemplo 2

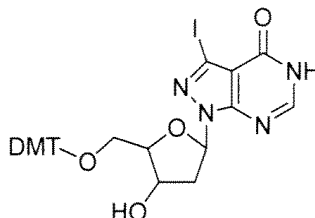
20 Este ejemplo ilustra la síntesis del 3'-fosforamidito de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-hidroxiuvinil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona **12** protegido.

1-(5-Dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-yodo-4-metoxi-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (**9**):



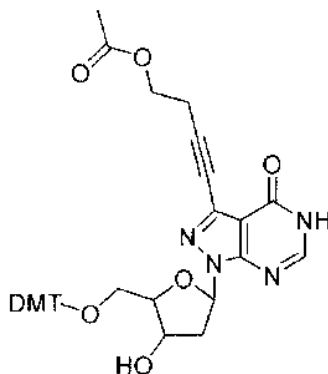
5 En un matraz de 500 ml se suspendió **2** (3,16 g, 8,06 mmol) en piridina anhidra (60 ml), después se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (3,55 g, 10,5 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h. La solución se concentró hasta un aceite de color amarillo, se particionó entre acetato de etilo y ácido cítrico al 10 %, y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (ac.) y salmuera, MgSO₄ y se concentró hasta una espuma de color amarillo. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 25-75 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **9** en forma de una espuma de color blanco (4,95 g, 88 % de rendimiento).

1-(5-Dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-indo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (**10**):



10 En un matraz de 500 ml se disolvió **9** (4,95 g, 7,1 mmol) en THF (25 ml), después se añadió un 50 % de NaOH (ac.) (5,5 ml) y metanol (20 ml). Calentar a 40-55 °C durante 3 horas y concentrar la mezcla de reacción hasta un sólido que se particionó entre acetato de etilo y ácido cítrico al 10 %. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (ac.) y salmuera. Las capas acuosas se retrolavaron con acetato de etilo, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron hasta una espuma de color amarillo pálido. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 50-100 % de acetato de etilo en hexanos para obtener **10** en forma de una espuma de color blanquecino (4,8 g, 100 % de rendimiento).

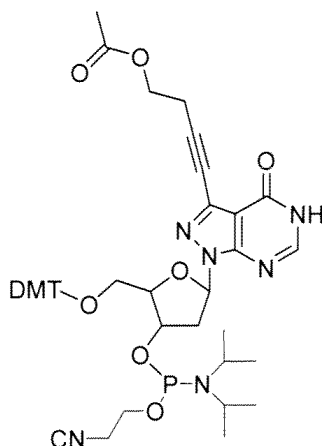
1-(5-Dimetoxitritil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-(4-acetoxibut-1-in-1-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (**11**):



20 En un matraz de 500 ml se disolvió **10** (4,8 g, 7,1 mmol) en DMF anhidra (40 ml), después se añadió trietilamina (2,87 g, 28,4 mmol) y acetato de but-3-inilo (1,2 ml, 10,7 mmol). La solución se desgasificó bajo argón, después se añadió CuI (324 mg, 1,7 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (984 mg, 0,85 mmol) y la reacción se agitó bajo argón durante 72 horas, después se concentró hasta un aceite de color pardo. El producto en bruto se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 50-100 % de acetato de etilo en hexanos. El producto impuro se cromatografió de nuevo mediante el uso de un 3-15 % de metanol en diclorometano, después se arrastró conjuntamente con CH₃CN anhidro para obtener **11** en forma de un sólido de color blanquecino (2,8 g, 59 % de rendimiento).

25

1-(3-(2-Cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidito-5-dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3-(4-acetoxibut-1-in-1-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (**12**):

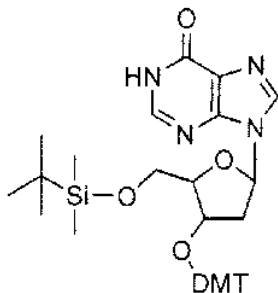


5 En un matraz de 500 ml se suspendieron **11** (2,8 g, 4,2 mmol) y tetrazoluro de diisopropilamonio (0,79 g, 4,6 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (75 ml), después se añadió N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo (1,85 ml, 5,9 mmol) y se agitó 14 h. La reacción se concentró y se disolvió en acetato de etilo, se lavó con un 5 % de NaHCO₃ (ac.) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta un aceite de color amarillo. El producto en bruto se disolvió en acetato de etilo anhidro y se precipitó con pentano anhidro; se repitió la precipitación y la goma resultante se secó para obtener **12** en forma de una espuma de color blanco (3,3 g, 92 % de rendimiento).

10 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la síntesis de la síntesis del 5'-fosforamidito de inosina **16** protegido.

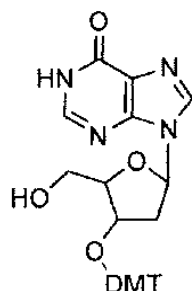
9-(5-(*tert*-Butilmetilsilil)-3-dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-hipoxantina (**14**):



15 En un matraz de 125 ml se suspendió desoxiinosina (**13**) (1,5 g, 6 mmol) en DMF anhidra (25 ml) y piridina (10 ml), después se añadió *tert*-butildifenilclorosilano (1,82 g, 6,6 mmol) y se agitó 12 horas. La reacción se valoró con silano adicional hasta que hubo presentes unas cantidades aproximadamente iguales de material de partida y de bis-silano. La mezcla de reacción se concentró para obtener un aceite y se añadió un 5 % de NaHCO₃ (ac.) para formar un sólido de color blanco que se filtró, aclarando con agua para retirar el material de partida. El producto en bruto se disolvió en DMF y piridina, se concentró para eliminar la humedad, después se disolvió en piridina anhidra y se
20 añadió dimetilaminopiridina (100 mg, catalítica), cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,24 g, 6,6 mmol), y se agitó durante 72 horas. Concentrar y particionar entre acetato de etilo y agua. Lavar la capa acuosa con ácido cítrico al 10 %, NaHCO₃ saturado (ac.) y salmuera, secar sobre MgSO₄ y concentrar hasta una espuma de color naranja. Purificar el producto en bruto mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 33 % de acetona en diclorometano para obtener **14** en forma de un sólido amorfo de color amarillo anaranjado (3,5 g, 73 % de rendimiento).

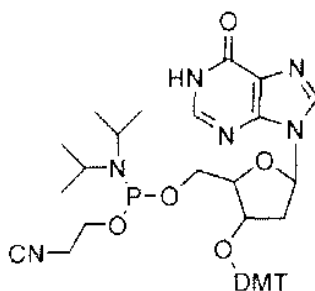
25

9-(3-Dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-hipoxantina (**15**):



5 En un matraz de 125 ml se suspendió **14** (3,5 g, 4,4 mmol) en THF (20 ml) para formar una suspensión. Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio en THF (8,8 ml, 1 M) junto con 10 ml adicionales de THF y la mezcla se transformó en una solución que se agitó durante 14 h. La reacción completada se concentró y se purificó mediante una cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un 0-5 % de CH₃OH en CH₂Cl₂ para obtener **15** en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,84 g, 75 % de rendimiento).

9-(5-(2-Cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidito-3-dimetoxitritil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-hipoxantina (**16**):

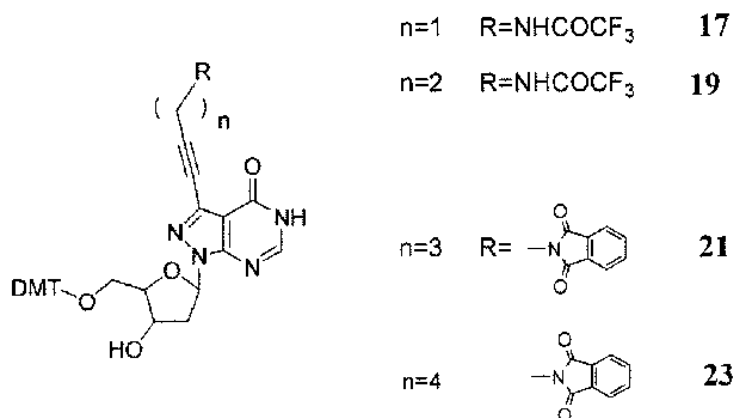


10 En un matraz de 125 ml se disolvió **15** (0,92 g, 1,66 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 ml), después se añadió tetrazoluro de diisopropilamonio (313 mg, 1,8 mmol) y N,N,N',N'-tetrakisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo (783 μl, 2,5 mmol) y la reacción se valoró con reactivo de fosforamidito adicional hasta que se completó. La suspensión se concentró y se disolvió en acetato de etilo, se lavó con un 5 % de NaHCO₃ (ac.) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta un aceite. El producto en bruto se disolvió en acetato de etilo anhidro y se precipitó con pentano anhidro; se repitió la precipitación y la goma resultante se secó para obtener **16** en forma de un sólido amorfo (715 mg, 57 % de rendimiento).

Ejemplo 4

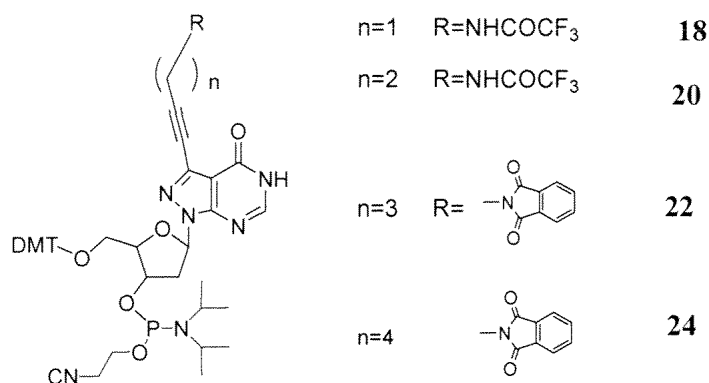
Este ejemplo ilustra la preparación de los fosforamiditos de 1 H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona 3-aminoalquil sustituida **18**, **20**, **22** y **24** y su incorporación en oligonucleótidos.

20 Procedimiento General para la preparación de los compuestos **17**, **19**, **21** y **23**, mostrados a continuación.



Se desoxigenó una solución del compuesto **10**, aminoalquinos protegidos (3,0 eq) y trietilamina (3,5 eq) en dimetilformamida anhidra (6,8 ml/mmol), (1,075 ml, 0,781 g, 7,72 mmol) mediante un flujo de argón y la aplicación de ultrasonidos (5 min). Se añadieron Pd(PPh₃)₄ (0,1 eq) y CuI (0,2 eq) y la mezcla resultante se agitó magnéticamente bajo argón a +60 °C. La mezcla resultante se concentró a vacío, y el residuo se diluyó con EtOAc. La solución resultante se lavó con ácido cítrico al 10 %, bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, el agente secante eliminó mediante una filtración, y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc) para dar los productos **17** (tiempo de reacción de 3,5 h, 81 % de rendimiento), **19** (tiempo de reacción de 1 h, 77 % de rendimiento), **21** (tiempo de reacción de 2,5 h, 88 % de rendimiento) y **23** (tiempo de reacción de 2,5 h, 88 % de rendimiento).

Procedimiento general para la preparación de los compuestos **18**, **20**, **22** y **24**, mostrados a continuación.



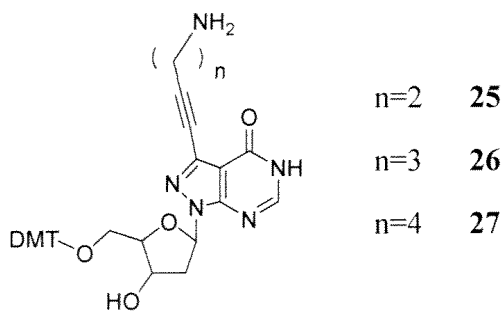
Se añadió N,N,N'-tetrakisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo (1,4 eq) a una mezcla de sustrato y tetrazoluro de diisopropilamonio (0,9 eq) en diclorometano seco (13 ml/mmol). La mezcla resultante se agitó magnéticamente bajo argón a la temperatura ambiente. La reacción se inactivó con bicarbonato de sodio acuoso saturado y se extrajo con DCM. La fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, el agente secante se eliminó mediante una filtración, y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en éter y se añadió gota a gota a hexano en agitación. El líquido se decantó del precipitado oleoso, que a continuación se disolvió en éter y se precipitó en hexano una vez más. El residuo final se secó a vacío para dar los productos **18** (tiempo de reacción de 4 h, 98 % de rendimiento), **20** (tiempo de reacción de 2 h, 91 % de rendimiento), **22** (tiempo de reacción de 12 h, 87 % de rendimiento), **24** (tiempo de reacción de 2 h, 74 % de rendimiento).

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la preparación de 5'-fosforamiditos de (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-1 H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona 3-meticarbomoiloalquinil sustituida **31**, **32** y **33** y su incorporación en oligonucleótidos.

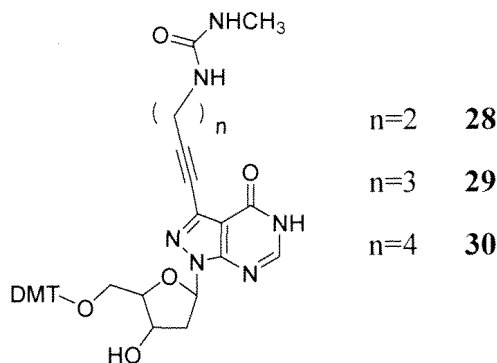
Procedimiento general para la preparación de los compuestos **25**, **26** y **27**:

ES 2 611 343 T3



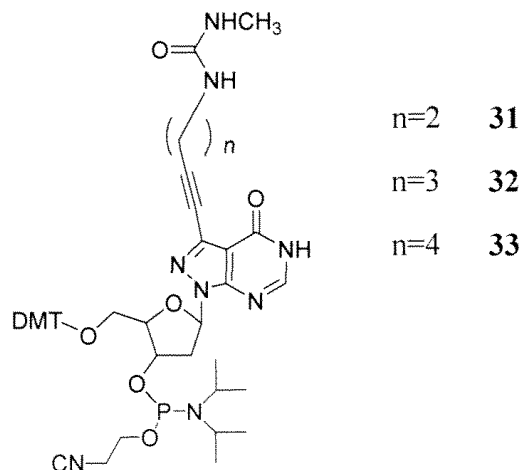
5 Se cargó una bomba Parr de 100 ml con 3,85 mmol de uno de los compuestos **19**, **21** o **23**. Se añadieron hidróxido de amonio concentrado (15 ml) y un 40 % de metilamina acuosa (15 ml) y la bomba se cerró herméticamente. Después de agitarse a 55 °C durante 1 h, la mezcla de reacción se enfrió y se concentró. El sólido resultante se lavó con agua y se secó a vacío para proporcionar un producto lo suficientemente puro (~ 90 % de rendimiento).

Procedimiento general para la preparación de los compuestos **28**, **29** y **30**:



10 A una solución de uno de los intermedios modificados con amina **25**, **26** o **27** (0,46 mmol) en 5 ml de DMF se añadió diisopropilamina (0,92 mmol) seguido de N-succinimidil N-metilcarboxamida (0,92 mmol). La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche y después se concentró. El material resultante se recogió en acetato de etilo, se lavó con NaHCO₃ saturado, NaCl saturado y se secó sobre MgSO₄. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se cromatografió sobre sílice eluyendo con un gradiente (5-10 %) de MeOH en diclorometano. La concentración de las fracciones del producto puro proporcionó los compuestos **28**, **29** o **30** con unos rendimientos del 70-80 %.

15 Procedimiento general para la preparación de los fosforamiditos **31**, **32** y **33**:



Los fosforamiditos **31**, **32** y **33** se prepararon mediante el uso del procedimiento descrito para los compuestos **18**,

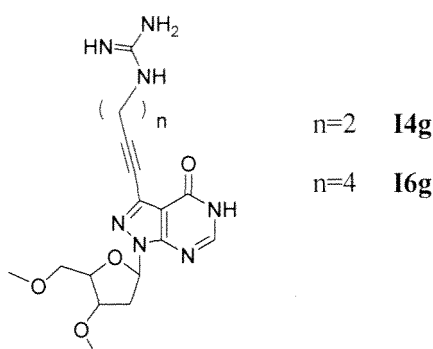
20, 22 y 24.

Síntesis de los oligonucleótidos

5 Los oligonucleótidos se prepararon a una escala de 200 nmol a partir de 3'-fosforamiditos y de soportes sólidos disponibles comercialmente (Glen Research, Inc.) siguiendo el protocolo estándar de síntesis y desprotección para un sintetizador de ADN (Applied Biosystems, Model 3900). Los oligonucleótidos 5'-dimetoxitritilados se purificaron mediante una RP-HPLC (C-18, bicarbonato de trietilamonio 0,1 M/acetronitrilo), se destilaron y se purificaron de nuevo. Los datos de los espectros de masas experimentales de ESI de todos los oligonucleótidos se correspondían con los valores calculados.

Ejemplo 6

10 Este ejemplo ilustra la preparación de oligonucleótidos que contienen las (2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas 3-guanidinoalquil sustituidas **I4 g** e **I6 g**.



15 Los oligonucleótidos que contenían las modificaciones I4g e I6g (Figura 1 y Figura 9) se sintetizaron según Roig, V.; Asseline, U. J. Am. Chem. Society, 2003, 125, 4616-4617, mediante un tratamiento de los precursores de los oligonucleótidos modificados con amina (25 nmol) con una solución 0,11 M de clorhidrato de 1-pirazol-1-carboxamida en Na₂CO₃ 1 M (30 ul) durante 1 día a la temperatura ambiente. Los oligonucleótidos modificados se purificaron mediante una cromatografía en fase inversa C18 en un gradiente de acetonitrilo en tampón de bicarbonato de trietilamonio 0,1 M. Se confirmó la identidad y la pureza de todos los oligonucleótidos modificados mediante una espectroscopía de masas.

20 Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra el comportamiento de las bases de 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona sustituidas en 3 de la invención en comparación con el de la hipoxantina cuando son sustituidas en oligonucleótidos en la formación de dúplex.

Determinación de la temperatura de fusión del dúplex.

25 La temperatura de fusión se determinó mediante la combinación de los oligonucleótidos que contienen el análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona con complementos naturales, con un experimento para cada análogo de inosina apareado con adenina, citosina, guanidina y timidina. Los oligonucleótidos que contienen el análogo de inosina se midieron en tres formatos: 1) análogo de inosina en la posición 6, medida a partir del extremo 5' del oligonucleótido; 2) análogo de inosina en la posición 9, medida a partir del extremo 5' del oligonucleótido; 3) análogo de inosina en ambas posiciones 6 y 9, medidas a partir del extremo 5' del oligonucleótido.

Secuencia (5'-3')	Posición de X	SEQ ID NO:
GT AAGXAGACAT AAC	6	2
GT AAGT AGXCAT AAC	9	3
GTAAGXAGXCATAAC	6 + 9	1

Los oligonucleótidos se combinaron a unas concentraciones equimolares de 2 μM en tampón que contiene NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM y Na-PIPES 10 mM (a pH 7). Las soluciones, en cubetas de 1 cm, se llevaron a 80 °C brevemente, después la temperatura se redujo hasta 15 °C. Las mediciones se llevaron a cabo con un

espectrofotómetro Cary Bio 400 UV-Vis equipado con un bloque de celda térmica peltier y una sonda de temperatura. La temperatura se subió por tramos a una velocidad de 0,8 °C/min desde 15 hasta 75 °C, monitorizando la longitud de onda a 268 nm. La temperatura de fusión se calculó como el punto intermedio entre las líneas iniciales de las porciones asociadas y disociadas de la curva de fusión.

5 Las temperaturas de fusión de los dúplex estudiados se muestran en las Figuras 10, 11, 12 y 13.

Puede observarse que los dúplex que contienen los análogos de la invención sustituidos con una base opuesta a la A, la T y la C en un dúplex generalmente más estable que los dúplex que contienen desoxiinosina. En el caso de la G se observan unas T_m similares, tanto para los análogos de desoxiinosina como para los de la invención.

10 También se observa que el análogo sustituido con aminobutinilo (I07) estabiliza los pares de A, T y C más que cualquier otro de los análogos estudiados.

Ejemplo 8

15 Este ejemplo (cuyos resultados se muestran en las Figuras 14 y 15) ilustra la capacidad de los cebadores de PCR sustituidos con 3-(hidroxibutinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y con 3-(aminobutinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona para participar eficientemente en las reacciones de amplificación. Adicionalmente se demostró que los análogos sustituidos tanto con hidroxibutinilo como con aminobutinilo se comportaban mejor que la 2'-desoxiinosina cuando se sustituían en un cebador.

20 Se llevó a cabo una PCR en tiempo real con un ABI Prism® 7900 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 50 ciclos de una PCR en dos etapas (95 °C durante 15 s, a 65 °C o a 70° durante 30 s) se analizó el perfil, después de 15 min iniciales a 95 °C. Se usó una mezcla maestra para PCR disponible comercialmente 2x Qiagen QuantiTect Probe (Qiagen nº de cat. 204345). La concentración final de ambos cebadores era de 0,5 µM. Cada 20 µl de reacción contenían 10 ng del ADN de molde. Se ensayaron de forma rutinaria muestras de ADN por triplicado mediante el uso de una placa de 384 pocillos.

Cebadores.

25 Se desarrolló un ensayo de adenovirus mediante el uso de un cebador *flap* inverso fluorogénico (Solicitud de EE.UU. 2007-0048758) que contenía un ligando aglutinante de surco menor (DPI₃) y fluoresceína (FAM) como marcaje fluorescente. El cebador directo contenía desoxiinosina, nucleósidos de 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona sustituidos con hidroxibutinilo (I04) o con aminobutinilo (I07) en varias posiciones (Figura 14 y 15). También se utilizó un cebador directo sin modificar como control positivo.

Ejemplo 9

30 Este ejemplo (cuyos resultados se muestran en la Figuras 16) ilustra la capacidad de múltiples sustituciones de los cebadores de PCR sustituidos 3-(hidroxibutinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5h)-ona y 3-(aminobutinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5h)-ona para participar eficientemente en la amplificación del objetivo resistente a la metilicina *Staphylococcus aureus* LGA251.

35 La PCR se lleva a cabo mediante el uso de las concentraciones finales de los componentes del ensayo de la mezcla de reacción es el control pasivo dT(8)-AP593. 0,035 µM, cebador directo 1,260 µM, cebador inverso 0,500 µM, sonda 0,200 µMm 1X de potenciador, 1X de mezcla maestra para PCR Tfi (Life Science Technologies, Inc) contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR, incluyendo uracil-N-glicosilasa (UNG). Se introdujeron veinte microlitros de la mezcla en una placa de PCR de 96 pocillos con 10 µl del ácido nucleico de muestra. La placa se cerró herméticamente con película adhesiva MicroAmp® Optical (Applied Biosystems, Foster City, CA) y después
40 se centrifugó para recoger la solución de ensayo en el fondo del pocillo de la placa. El ensayo se llevó a cabo a continuación en una máquina de PCR en tiempo real ABI 7500 DX Fast Block con el protocolo mostrado en la siguiente en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de PCR en tiempo real ABI 7500DX Fast Block

Etapa	Tiempo	Temperatura
UNG	2 min	50 °C
Desnaturalizar	2 min	93 °C

Etapa	Tiempo	Temperatura
Ciclos de la PCR (45X)	10 s	93 °C
	30 s	56 °C
	20 s	72 °C
Tiempo total	1 h 10 min	

5 Puede observarse que el dúplex que contiene la 3-(hidroxibutiril)-1H-pirazolo[3,4-D]pirimidin-4(5H)-ona tiene sustituidas tres A y dos T, amplificó bien a 56° y a 60 °C con unos ct de 36 y de 36, respectivamente. A diferencia de los mismos sustitutos con inosina, sólo amplificaron a 56 °C con un Ct de 42. En el caso de la G, se observan unas T_m similares tanto para la desoxiinosina como para los análogos de la invención. Esto ilustra que los cebadores con múltiples sustituciones de aminobutilo amplifican bien a 60 °C, mientras que un cebador sustituido de forma similar con inosinas no amplificó a esta temperatura. Esto confirma de nuevo la capacidad del análogo de aminobutilo de la invención de estabilizar los dúplex cuando está sustituido; en este caso, para A y T.

10 Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra que cuando una 3-(3-(hidroxibutiril)-1H-pirazolo[3,4-D]pirimidin-4(5h)-ona es sustituida por T en un cebador, es reconocida por la polimerasa como una G, y que se incorpora C como la base complementaria en el amplicón sintetizado.

15 La PCR se llevó a cabo según se ha descrito en el Ejemplo 9. La secuencia objetivo y las secuencias del cebador se muestran en la Figura 17. Los amplicones obtenidos a partir de la amplificación con el cebador natural, el cebador F(dI) y el cebador F(I07), fueron sometidos a un análisis de secuenciación. Las secuencias de los amplicones generados por estos cebadores se muestran en la Figura 17. El amplicón generado por el cebador natural incorporaba dos A complementarias de las T de los cebadores. Sin embargo, con el cebador F(dI) y el cebador F(I07), se incorporaron dos C en cada caso. Por lo tanto, la polimerasa de ADN incorporó una C complementaria de la inosina y de la aminobutilinosina.

Referencias

Documentos de Patente de EE.UU.

25 Patente de EE.UU. nº 3.996.345
 Patente de EE.UU. nº 4.351.760
 Patente de EE.UU. nº 5.177.196
 Patente de EE.UU. nº 5.419.966
 Patente de EE.UU. nº 5.492.806
 Patente de EE.UU. nº 5.512.677
 Patente de EE.UU. nº 5.525.464
 30 Patente de EE.UU. nº 5.539.082
 Patente de EE.UU. nº 5.556.752
 Patente de EE.UU. nº 5.585.481
 Patente de EE.UU. nº 5.696.251
 Patente de EE.UU. nº 5.714.331
 35 Patente de EE.UU. nº 5.736.626
 Patente de EE.UU. nº 5.766.855
 Patente de EE.UU. nº 5.773.571
 Patente de EE.UU. nº 5.801.155
 Patente de EE.UU. nº 6.312.894
 40 Patente de EE.UU. nº 6.727.356
 Patente de EE.UU. nº 6.790.945
 Patente de EE.UU. nº 7.045.610
 Patente de EE.UU. nº 7.348.146
 Patente de EE.UU. nº 7.319.022
 45 Patente de EE.UU. nº RE 38.416

Documentos de Patente Internacional

Publicación de Patente Internacional WO92/10588

Publicación de Patente Internacional WO96/17957

Otras publicaciones

- Ausubel, et al., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996)
- 5 Beaucage y Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)
- Bergstrom et al, Nucl. Acids. Res., 25: 1935-1942 (1997)
- Chen et al., Nucl. Acids Res., 23: 2662-2668 (1995)
- Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press (1991)
- Gait (ed.), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1984)
- 10 Graig, J. Mol. Biol., 19: 548-555 (1966)
- T. W. Greene y P. G. Futs, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2ª ed. 1991)
- Harrison y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-1996)
- 15 Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sexta edición, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996
- Lee H et al., Methods Mol. Biol. 855: 155-74, 2012
- Loakes et al., J. Mol. Biol., 270: 426-435 (1997)
- Loakes, Nucl. Acids Res., 29: 2437-2447 (2001)
- Ming et al., Nucl. Acids Symp. Series nº 52: 471-472 (2008)
- 20 Nielsen et al., Science 254: 1497-1500 (1991)
- Niemz, A. et al Trends Biotechnol., 29: 240-50 (2011)
- Palissa et al., Z. Chem. 27: 216 (1987)
- Reddy, B. S. P., Dondhi, S. M., y Lown, J. W., Pharmacol. Therap., 84: 1-111 (1999)
- 25 Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- Singh et al, Chem. Comm., 455-456 (1998)
- Uhlmann et al. Angew. Chem. Int. Ed. 37: 2796-2823 (1998)
- Walker, W. L., Kopka, J. L. y Goodsell, D. S., Biopolimers, 44: 323-334 (1997)
- Watkins y SantaLucia, Nucleic Acids Res., 23: 62588-6267 (2005)
- 30 Wemmer, D. E. y Dervan P. B., Current Opinion in Structural Biology, 7: 355-361 (1997)
- Wengel J., Acc. Chem. Res., 32: 301-310 (1998)
- Zimmer, C & Wahnert, U. Prog. Biophys. Molec. Bio. 47: 31-112 (1986)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Vorobiev, Alexei Lukhtanov, Eugeny Scarr, Noah
- <120> Análogos de 3-alquiniil pirazolopirimidina funcionalizada como bases universales y métodos de uso
- <130> ELI-0118 (136520.247)
- 40 <160> 48
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Dúplex
- <220>
- <221> misc_feature
- 55 <222> (6)..(6)
- <223> n es 2'-desoxinosina o 2-desoxi--D-ribofuranosil-3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona
- <220>
- <221> misc_feature
- 60 <222> (9)..(9)
- <223> n es 2'-desoxinosina o 2-desoxi--D-ribofuranosil-3-alquiniil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona

ES 2 611 343 T3

<400> 1
gaatgnagnc ataac 15

5 <210> 2
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Dúplex

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> X es 2'-desoxinosina o a 2-desoxi- -D-ribofuranosil-3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> X es 2'-desoxinosina o 2-desoxi- -D-ribofuranosil-3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona

<400> 2
gtaagnagac ataac 15

25 <210> 3
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Dúplex

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> X es 2'-desoxinosina o 2-desoxi- -D-ribofuranosil-3-alquini-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona

40 <400> 3
gtaagtagnc ataac 15

45 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador ADV-1

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g o t

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es dl

65 <400> 4
ggccccgagat gngcatgta 19

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 611 343 T3

<220>
<223> Cebador ADV-2

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es a, c, g o t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es dl

15 <400> 5
ggcccgagat gtncatgta 19

20 <210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador ADV-3

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es dl

35 <400> 6
ggcccgagat gtgnatgta 19

40 <210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> ADV-4

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es dl

55 <400> 7
ggcccgagat gtgcntgta 19

60 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> ADV-5 primer

70 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es l04

75 <400> 8
ggcccgagat gngcatgta 19

80 <210> 9
<211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador ADV-6

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 10 <223> n es I04

 <400> 9
 ggcccgagat gtncatgta 19

 15 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador ADV-7

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (14)..(14)
 <223> n es I04

 <400> 10
 ggcccgagat gtgnatgta 19

 30 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador ADV-8

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (15)..(15)
 <223> n es I04

 <400> 11
 45 ggcccgagat gtgcntgta 19

 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador ADV-9

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es I07

 60 <400> 12
 ggcccgagat gngcatgta 19

 <210> 13
 <211> 19
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 611 343 T3

<220>
<223> ADV-10

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es I07

10 <400> 13
ggcccgagat gtncatgta 19

15 <210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador ADV-11

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es I07

30 <400> 14
ggcccgagat gtgnatgta 19

35 <210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador ADV-12

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es I07

50 <400> 15
ggcccgagat gtgcntgta 19

55 <210> 16
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador ADV-L1

65 <400> 16
ggcccgagat gtgcatgta 19

70 <210> 17
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> ADV-L1

80 <400> 17
tacatgcaca tctcgggcc 19

ES 2 611 343 T3

5
<210> 18
<211> 3
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador ADV-MGB-FAM primer

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es MGB

15
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es FAM

20
<400> 18
nnaataaatc ataagatggc tacccttcg a 31

25
<210> 19
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia flap diana no específica

30
<400> 19
aataaatcat aa 12

35
<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Cebador ADV-25

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es dl

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es dl

<400> 20
ggcccgat gngnatgta 19

55
<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Cebador ADV-26

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es dl

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es dl

<400> 21
ggcccgagat gngcntgta 19

10
<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Cebador ADV-27

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es dl

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es dl

30
<400> 22
ggcccgagat gngcangta 19

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<223> ADV-28

40
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es dl

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es dl

50
<400> 23
ggcccgagat gngcatnta 19

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<223> Cebador ADV-13

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es 104

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)

ES 2 611 343 T3

<223> n es 104

<400> 24
ggcccgat gngnatgta 19

5

<210> 25
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador ADV-14

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es 104

15

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 104

20

<400> 25
ggcccgat gngcngta 19

25

<210> 26

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Cebador ADV-15

35

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es 104

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es 104

45

<400> 26
ggcccgat gngcngta 19

50

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador ADV-16

55

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es 104

60

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es 104

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <400> 27
 ggcccgagat gngcatnta 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador ADV-17
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es I07
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n es I07
 <400> 28
 ggcccgagat gngnatgta 19
 25
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> ADV-18
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es I07
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es I07
 45
 <400> 29
 ggcccgagat gngcntgta 19
 50
 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador ADV-19
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es I07
 65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es I07

ES 2 611 343 T3

<400> 30
ggcccgagat gngcangta 19

5 <210> 31
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> ADV-20

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es I07

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es I07

25 <400> 31
ggcccgagat gngcatnta 19

30 <210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador ADV-29

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n es dl

45 <400> 32
ggcccgagat gtgcatgna 19

50 <210> 33
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador ADV-30

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n es dl

65 <400> 33
ggcccgagat gtgcatgtn 19

70 <210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> ADV-21

80 <220>
<221> misc_feature

ES 2 611 343 T3

<222> (18)..(18)
<223> n es l04

5 <400> 34
ggcccgagat gtgcatgna 19

10 <210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador ADV-22

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n es l04

25 <400> 35
ggcccgagat gtgcatgtn 19

30 <210> 36
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador ADV-23

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n es l07

45 <400> 36
ggcccgagat gtgcatgna 19

50 <210> 37
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador ADV-24

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n es l07

65 <400> 37
ggcccgagat gtgcatgtn 19

70 <210> 38
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Cebador ADV-32

80 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n es dl

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es dl

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es dl

15
 <400> 38
 ggcccgagnt gngcntgta 19

20
 <210> 39
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Cebador ADV-31

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es dl

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es dl

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es dl

45
 <400> 39
 ggcccgagan gngcntgta 19

50
 <210> 40
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Cebador ADV-34

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es I04

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es I04

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es I04

75
 <400> 40
 ggcccgagnt gngcntgta 19

80
 <210> 41

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador ADV-33
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (10)..(10)
 <223> n es I04
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12)..(12)
 <223> n es I04
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (15)..(15)
 <223> n es I04
 <400> 41
 ggccccgagan gngcntgta 19
 25 <210> 42
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador ADV-36
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (9)..(9)
 <223> n es I07
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (12)..(12)
 <223> n es I07
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (15)..(15)
 <223> n es I07
 <400> 42
 ggccccgagnt gngcntgta 19
 50 <210> 43
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ADV-35
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es I07
 65 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 611 343 T3

<222> (12)..(12)
<223> n es I07

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es I07

10 <400> 43
ggccccgagan gngcntgta 19

15 <210> 44
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> LGA-L23

25 <400> 44
gtatattcc gttatttct aaagcact 28

30 <210> 45
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> LGA-L24

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n es dl

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es dl

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n es dl

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n es dl

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n es dl

65 <400> 45
gtatantcc gttantnct nangcact 28

60 <210> 46
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> LGA-L25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es I07
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es I07
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es I07
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n es I07
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> n es I07
 25

<400> 46
 gtatantcc gttantnct nangcactg 29
 <210> 47
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> LGA-E3
 35

<400> 47
 aataaatcat aaggccaagg cgagatacta gtaaacc 37
 40

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45

<220>
 <223> LGA-FAM5
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es MGB
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n es FAM
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es Super G
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es Super A

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n es Super T

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n es Super T

15
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es Super T

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es Super A

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es Super A

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n es EDQ (sonda de detección)

<400> 48
nnnataanan nngtntnggn 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la monitorización de la amplificación de los polinucleótidos de un conjunto de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo, que comprende:

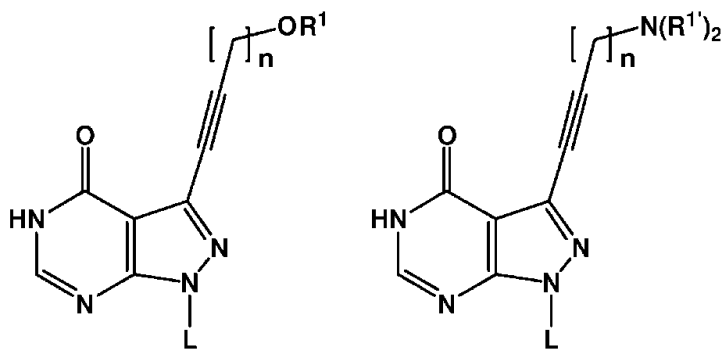
(a) proporcionar una mezcla que comprende una muestra que contiene las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, uno más de un cebador de oligonucleótidos sustancialmente complementario de una porción de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótidos y una sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable de entre 5 y 100 bases,

en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable tiene un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de un fosfato de azúcar, un esqueleto de un fosfato de azúcar modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante de los mismos,

en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos tiene una secuencia sustancialmente complementaria de una región de la sonda de al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo,

en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene una secuencia complementaria de una porción adyacente o solapante de la región de sonda de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, y

en el que dicha sonda oligomérica de ácidos nucleicos tiene al menos una base de ácidos nucleicos sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona; en el que el análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona comprende la Fórmula III o la Fórmula IV:



Fórmula III

Fórmula IV

en las que:

R¹ es H;

R^{1'} es H;

L es un análogo de un esqueleto de azúcar o de azúcar/fosfato, que incluye, como pero no se limita a, un esqueleto de ADN, de ARN, de PNA, un ácido nucleico bloqueado, un ADN modificado, un PNA modificado, un ARN modificado, o cualquier combinación de los mismos, y

n es entre 1 y 5; y

(b) incubar la mezcla en unas condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la amplificación de los polinucleótidos se monitoriza de forma continua mediante la detección de la hibridación de la sonda oligomérica de ácidos nucleicos con el objetivo amplificado.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la amplificación de los polinucleótidos la realiza una enzima de polimerización en condiciones isotérmicas.

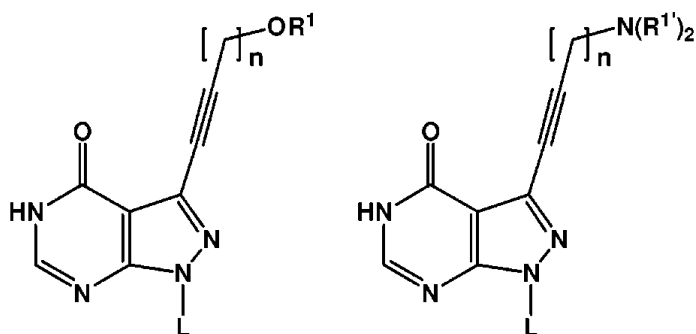
4. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable comprende adicionalmente un ligando aglutinante de surco menor unido covalentemente.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable comprende adicionalmente un inactivador.

6. El método de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos cebadores oligoméricos de ácidos nucleicos tiene al menos una base de un ácido nucleico sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

7. Un método para la monitorización de la amplificación de los polinucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, que comprende:

- (a) proporcionar una mezcla que comprende una muestra que contiene las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, uno o más cebadores de oligonucleótidos de entre 5 y 50 bases, una sonda oligomérica de ácidos nucleicos detectable de entre 5 y 100 bases, una enzima de polimerización y sustratos de nucleótidos en el que dichos cebadores de oligonucleótidos tienen un componente de esqueleto seleccionado del grupo que consiste en un esqueleto de un fosfato de azúcar, un esqueleto de un fosfato de azúcar modificado, un esqueleto de un ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante de los mismos, en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene una secuencia sustancialmente complementaria de una porción adyacente o solapante de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos tiene al menos una base de ácidos nucleicos sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, en el que el análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona comprende la Fórmula III o la Fórmula IV:



Fórmula III

Fórmula IV

en las que:

R¹ es H;
R¹ es H;

- L es un análogo de un esqueleto de azúcar o de azúcar/fosfato, que incluye, como pero no se limita a, un esqueleto de ADN, de ARN, de PNA, un ácido nucleico bloqueado, un ADN modificado, un PNA modificado, un ARN modificado, o cualquier combinación de los mismos; y
n es entre 1 y 5;

(b) incubar la mezcla en unas condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa con actividad de 5'-nucleasa.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la amplificación de los polinucleótidos se monitoriza de forma continua mediante la detección de la hibridación de los ácidos nucleicos, en el que la hibridación de los ácidos nucleicos se identifica por la extensión de los cebadores de oligonucleótidos con la enzima de polimerización.

9. El método de la reivindicación 7, en el que los cebadores de oligonucleótidos comprenden bases de ácidos nucleicos que son bases normales, análogos de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y bases modificadas, en el que al menos uno de los cebadores de oligonucleótidos comprende al menos un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona y al menos una base modificada.

10. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7, en el que más de uno de dichos cebadores oligoméricos de ácidos nucleicos tiene al menos una base de ácidos nucleicos sustituida por un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona.

11. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7, en el que al menos uno de dichos cebadores de oligonucleótidos comprende adicionalmente un ligando aglutinante de surco menor unido covalentemente.

12. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7, en el que el número de ciclos umbral (Ct), medido en el ácido nucleico objetivo amplificado, es similar al Ct cuando se usan cebadores no sustituidos.

13. El uso de un análogo de 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona como base universal, en el que el análogo se usa en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

Figura 1

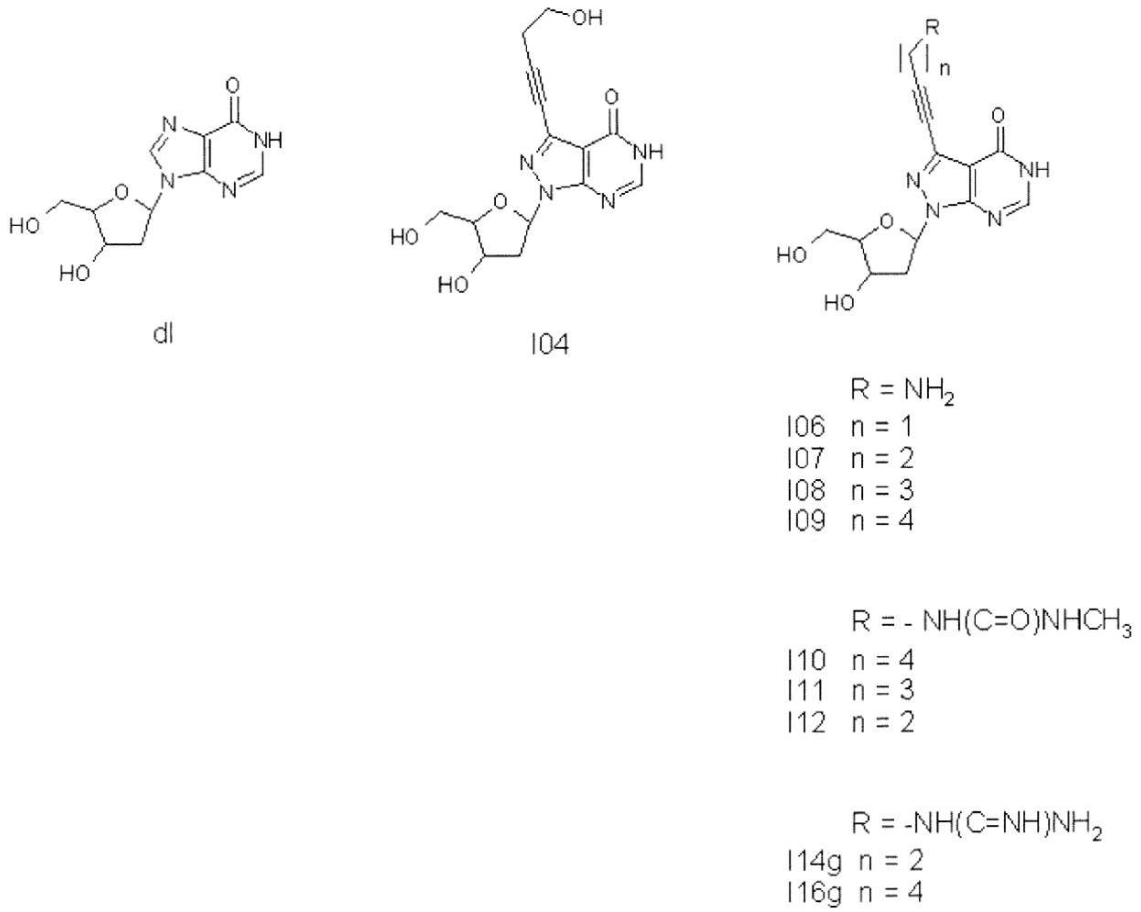


Figura 2

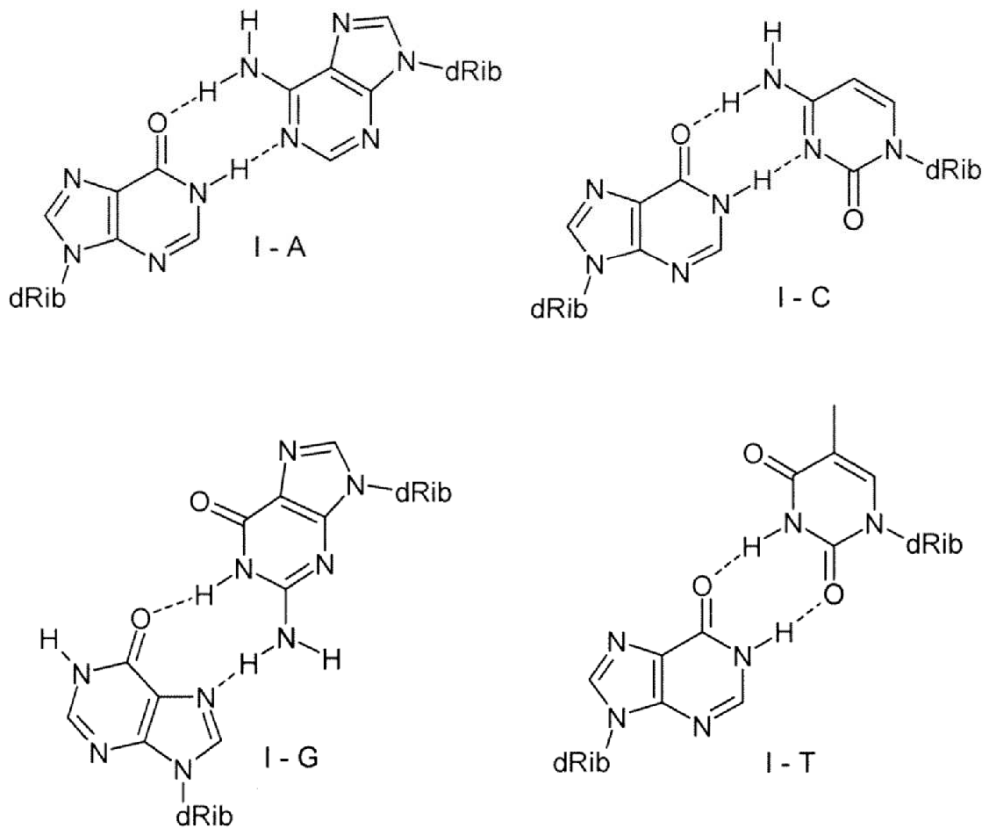


Figura 3

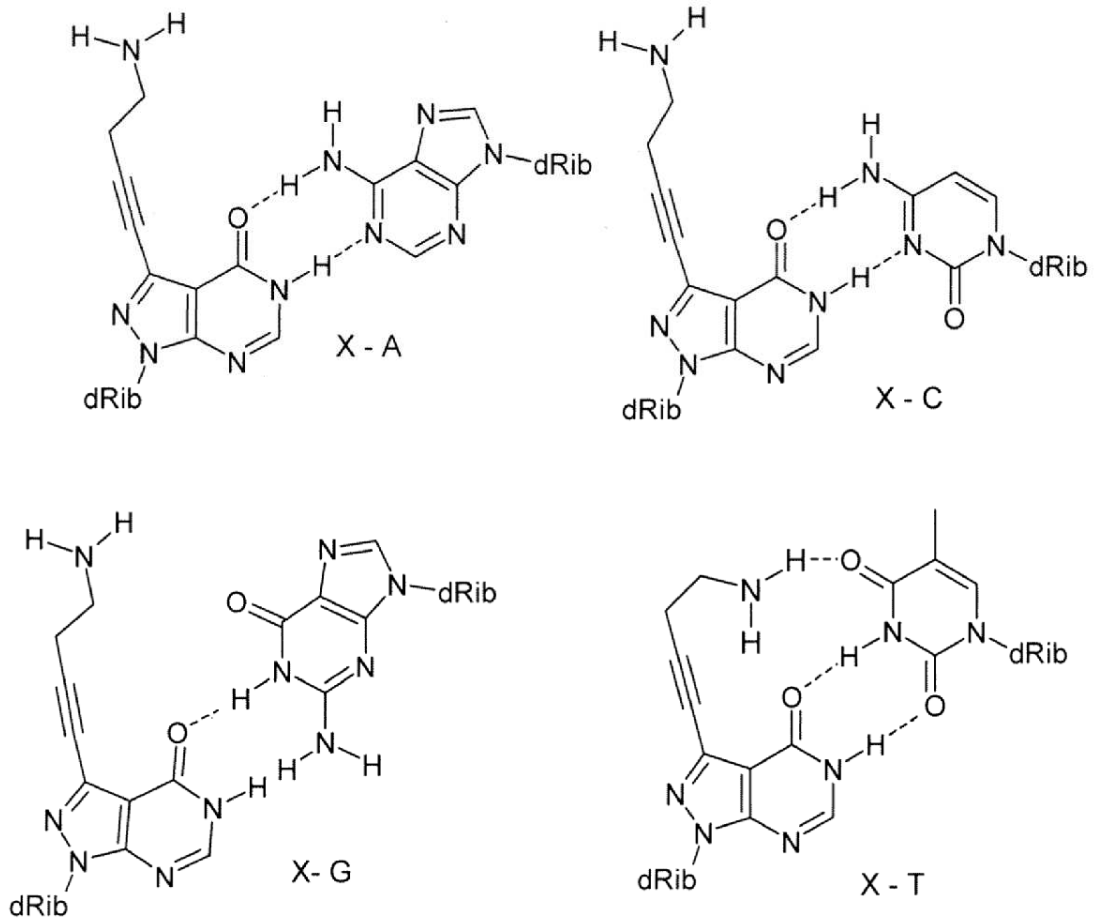


Figura 4

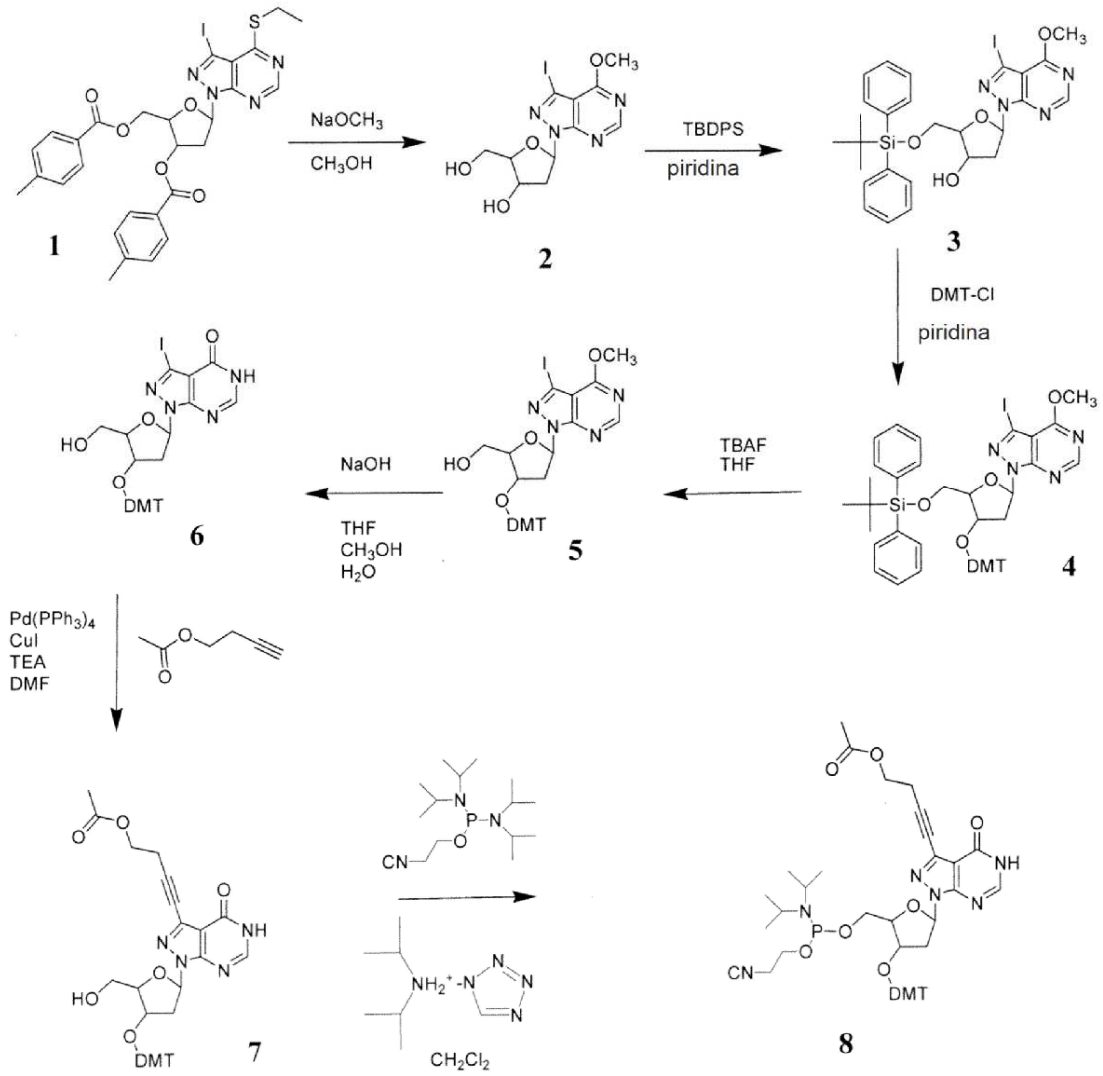


Figura 5

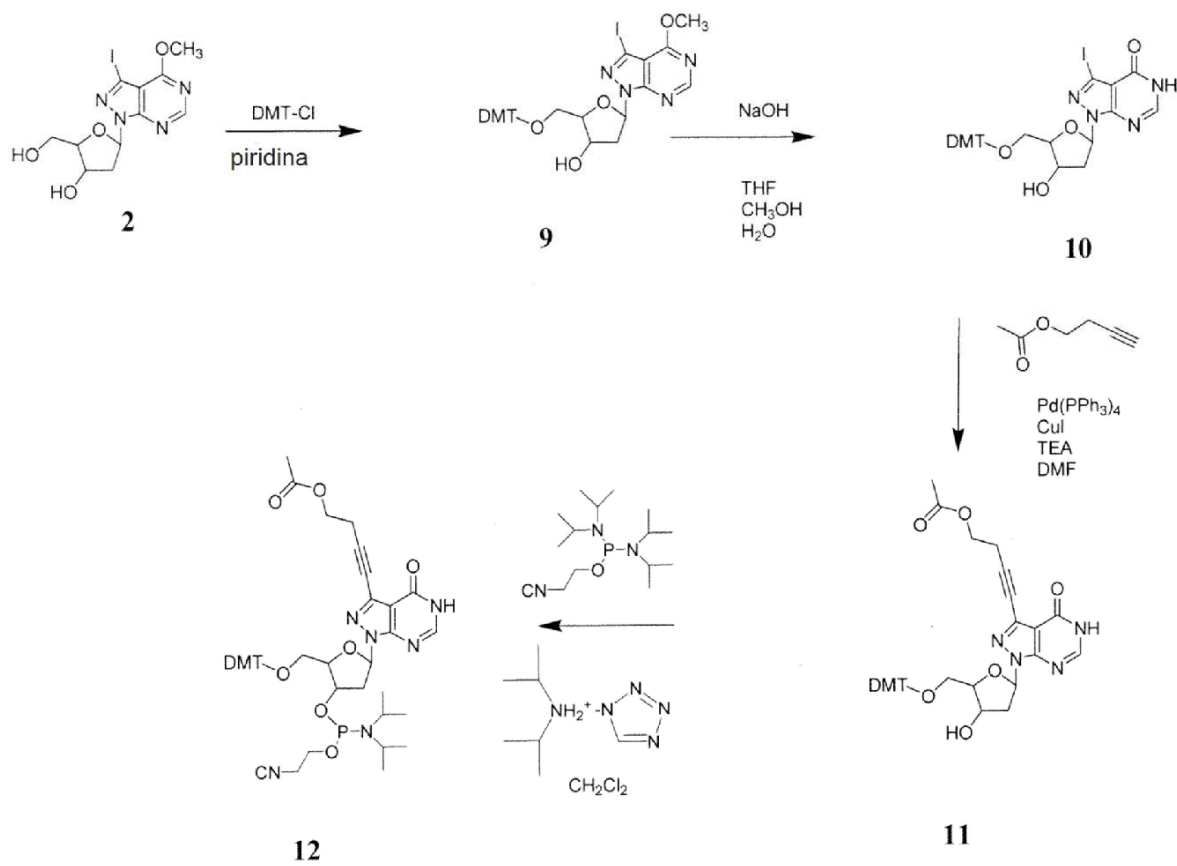


Figura 6

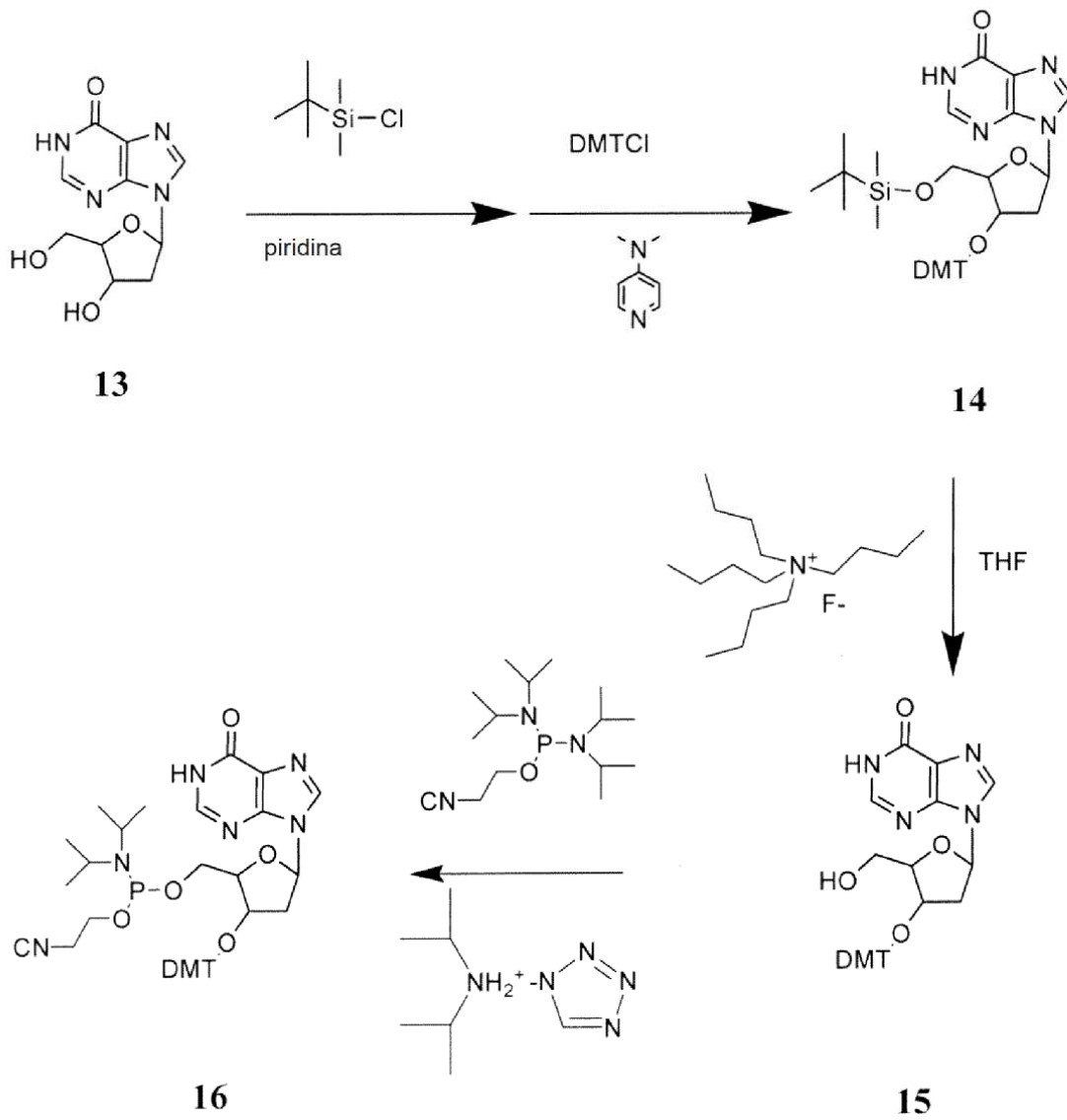


Figura 7

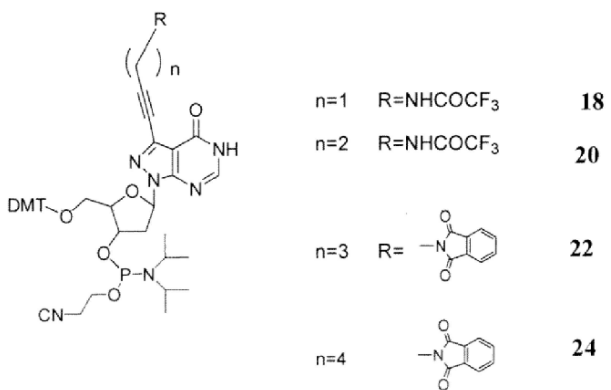
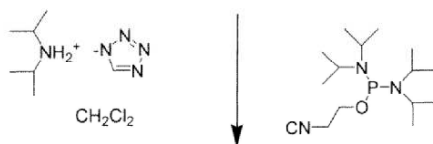
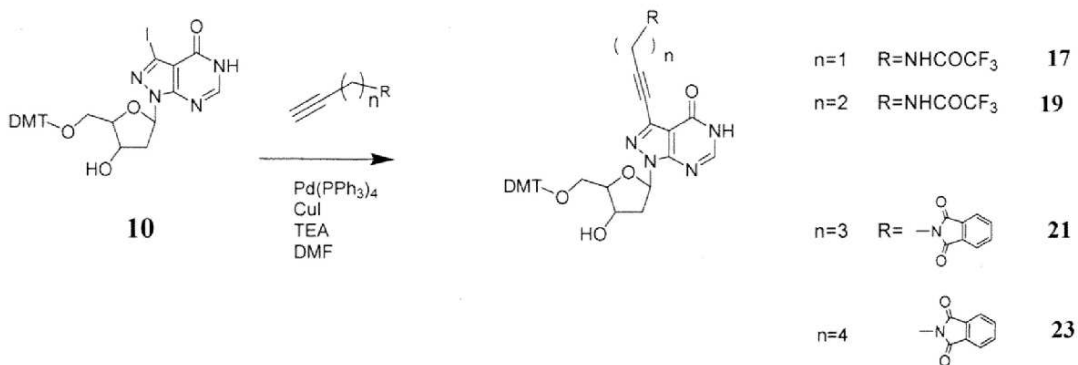


Figura 8

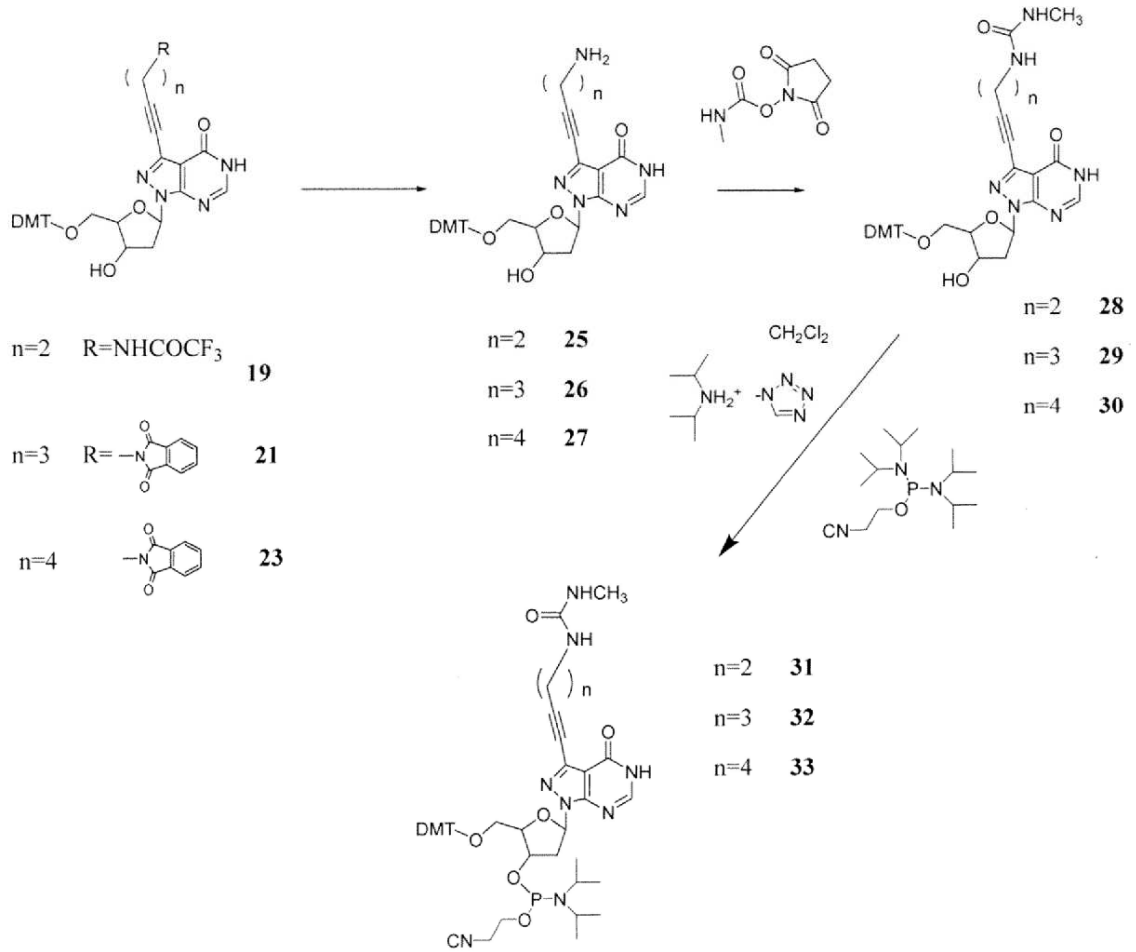


Figura 9

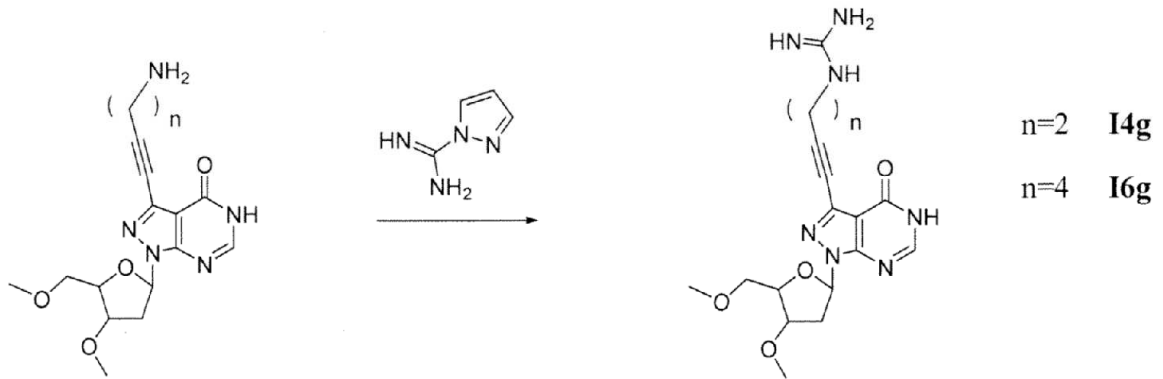


Figura 10

Secuencia 1 (5'-3')	Secuencia 2 (5'-3')	posición	par	apareamiento	X=dI	X=I04
GTAAGXAGACATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6	X/A	54,0	51,7	52,9
GTAAGXAGACATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6	X/T	54,0	47,2	48,7
GTAAGXAGACATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6	X/C	56,3	52,3	53,8
GTAAGXAGACATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6	X/G	57,7	47,0	45,4
GTAAGTAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	9	X/T	54,3	52,1	54,8
GTAAGTAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	9	X/A	54,0	47,9	50,1
GTAAGTAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	9	X/C	57,3	52,3	55,0
GTAAGTAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	9	X/G	57,4	49,1	47,2
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/T, X/A	54,0	46,1	48,8
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/T, X/T	54,0	41,6	44,3
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/T, X/C	56,3	46,4	50,0
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/T, X/G	57,7	41,2	40,8
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/A, X/A	54,3	51,1	54,1
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/C, X/A	57,3	50,8	54,0
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/G, X/A	57,4	47,4	46,2
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/A, X/T	54,6	46,9	49,7
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/C, X/T	57,3	46,8	49,8
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/G, X/T	57,5	43,1	41,4
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/A, X/C	56,2	51,6	55,0
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/C, X/C	59,6	51,5	54,7
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/G, X/C	59,8	47,6	47,2
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/A, X/G	58,1	46,7	46,5
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/C, X/G	60,7	46,6	46,7
GTAAGXAGXCATAAC	AAAGTTATGTCCTTACAGAAA	6+9	X/G, X/G	61,4	42,6	38,1

X=I06	X=I07	X=I08	X=I09	X=I10	X=I11	X=I4g	X=I6g	X=I12
53,1	53,8	53,7	53,4	52,1	52,5	54,8	52,2	52,7
50,3	53,3	53,1	51,0	47,8	48,4	51,5	49,2	48,8
54,4	55,1	54,8	54,2	52,9	53,5	55,9	54,6	53,9
45,9	47,2	46,5	46,1	44,9	45,2	47,0	46,2	45,9
55,6	57,4	56,8	55,8	54,2	55,6	56,7	56,2	55,1
51,7	55,9	56,0	52,7	49,1	50,6	54,0	51,6	50,2
55,9	57,5	56,6	55,8	54,0	55,1	56,9	56,2	55,2
47,6	49,4	48,2	47,7	47,1	47,7	48,2	48,2	47,2
51,0	56,2	55,8	52,1	47,2	48,8	52,5	N/T	N/T
48,0	55,2	54,7	49,0	42,4	44,5	48,6	N/T	N/T
51,8	57,2	56,2	52,7	48,5	49,7	52,6	N/T	N/T
43,0	49,9	48,2	44,1	40,2	41,5	44,4	N/T	N/T
55,0	57,9	57,4	55,4	52,5	54,6	57,1	N/T	N/T
55,1	58,2	56,8	55,1	52,4	53,7	57,0	N/T	N/T
47,5	49,5	48,6	46,9	45,6	46,4	48,5	N/T	N/T
51,8	57,2	56,4	52,5	47,2	50,0	52,8	N/T	N/T
52,5	57,2	56,2	52,8	47,7	49,2	52,4	N/T	N/T
42,9	48,5	47,6	44,0	39,5	42,0	44,2	N/T	N/T
56,2	58,6	58,1	56,2	52,1	55,6	57,8	N/T	N/T
56,1	58,7	56,9	55,8	52,2	54,8	57,9	N/T	N/T
48,4	50,6	49,4	47,9	46,2	47,7	50,1	N/T	N/T
47,6	51,0	49,8	47,9	45,5	47,5	49,6	N/T	N/T
47,8	51,7	49,4	47,8	45,5	46,6	49,7	N/T	N/T
38,8	42,2	40,4	38,6	27,6	28,6	29,9	N/T	N/T

N/T - No ensayado

Figura 11

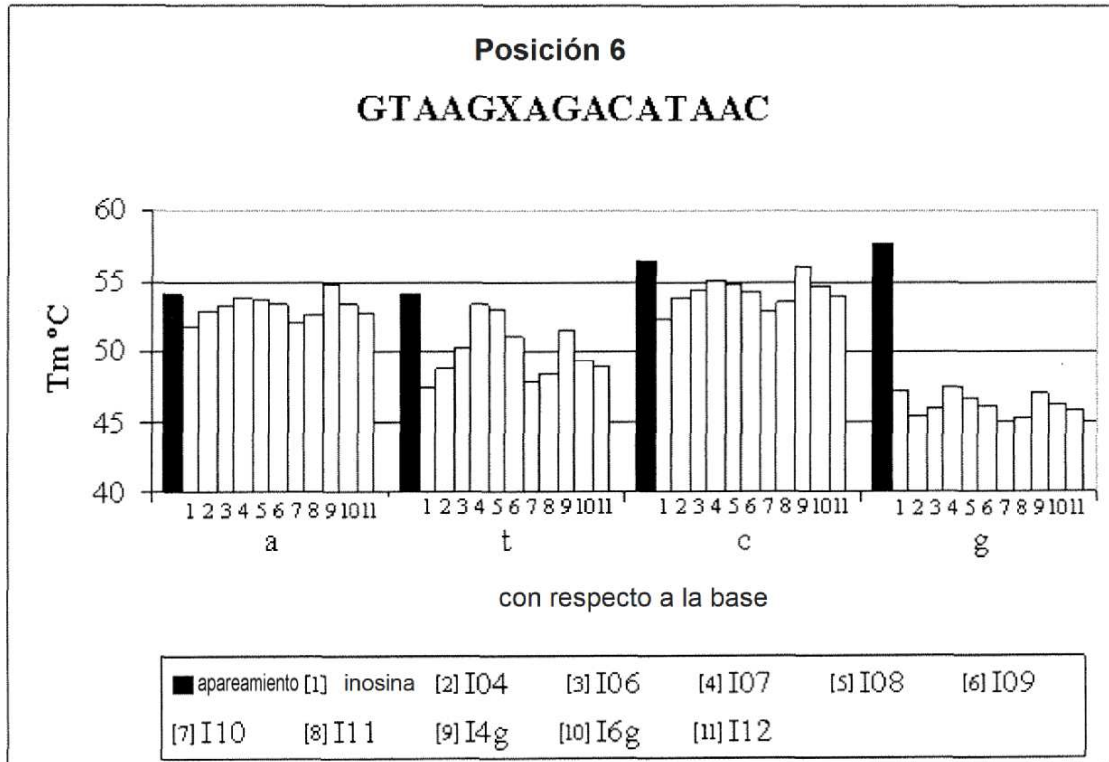


Figura 12

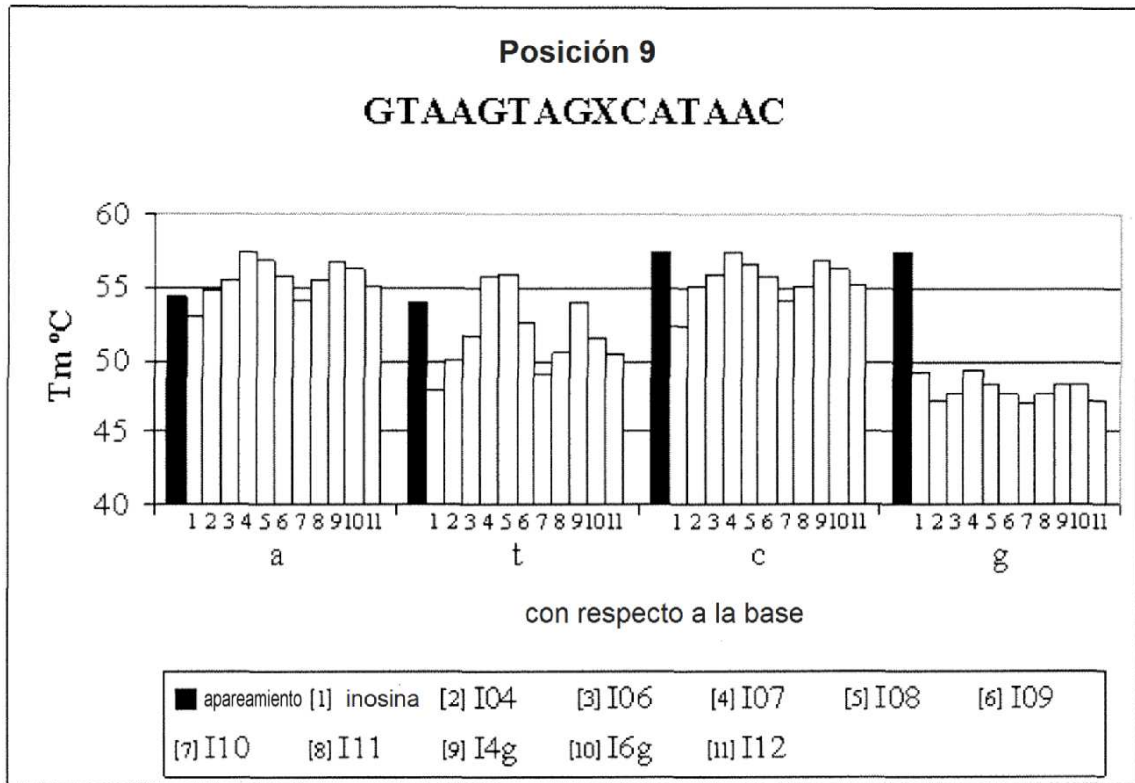


Figura 13

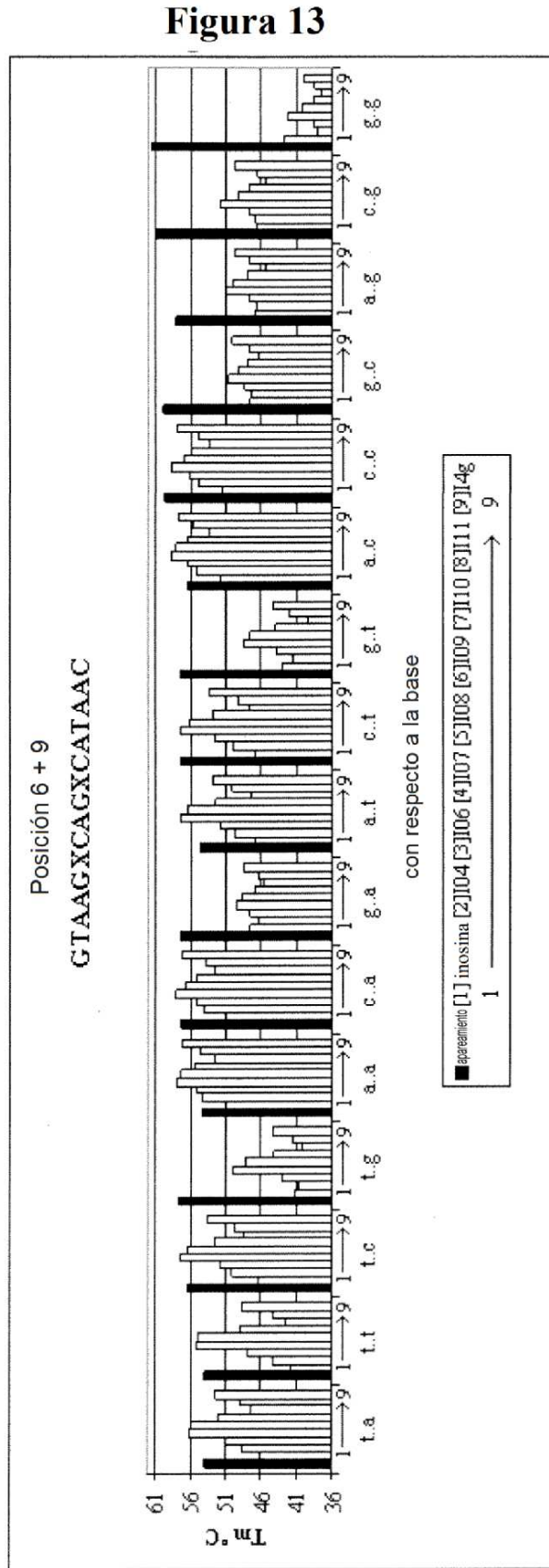


Figura 13

Figura 14

cebador directo	secuencia (5'-'3')	par	T _m	Ct (65/95°C)	Ct (70/95°C)
ADV-1	GCCCCGAGATG (dI) GCATGTA	dI/A	67,7	25	25,5
ADV-2	GCCCCGAGATGT (dI) CATGTA	dI/C	65,4	24	promedio: 32
ADV-3	GCCCCGAGATGTG (dI) ATGTA	dI/G	61,2	25	promedio: 45
ADV-4	GCCCCGAGATGTCC (dI) TGTA	dI/T	65,9	24	31
ADV-5	GCCCCGAGATG (I04) GCATGTA	I04/A	68,3	25	26
ADV-6	GCCCCGAGATGT (I04) CATGTA	I04/C	67,9	24	25
ADV-7	GCCCCGAGATGTG (I04) ATGTA	I04/G	60,5	28	37
ADV-8	GCCCCGAGATGTCC (I04) TGTA	I04/T	67,1	24	26.5
ADV-9	GCCCCGAGATG (I07) GCATGTA	I07/A	68,9	24	25
ADV-10	GCCCCGAGATGT (I07) CATGTA	I07/C	67,4	24	24
ADV-11	GCCCCGAGATGTG (I07) ATGTA	I07/G	61,4	25,5	31
ADV-12	GCCCCGAGATGTCC (I07) TGTA	I07/T	66,5	24,5	26
ADV-L1	GCCCCGAGATGTCATGTA	apareamiento	69,7	24	24
ADV-C	TACATGCAATCTCGGCCC	Complemento			

cebador inverso	secuencia (5'-'3')
ADV-MCB-FAM	MCB-FAM-AATAAATCATACAGTAGGCTACCCCTTCGA

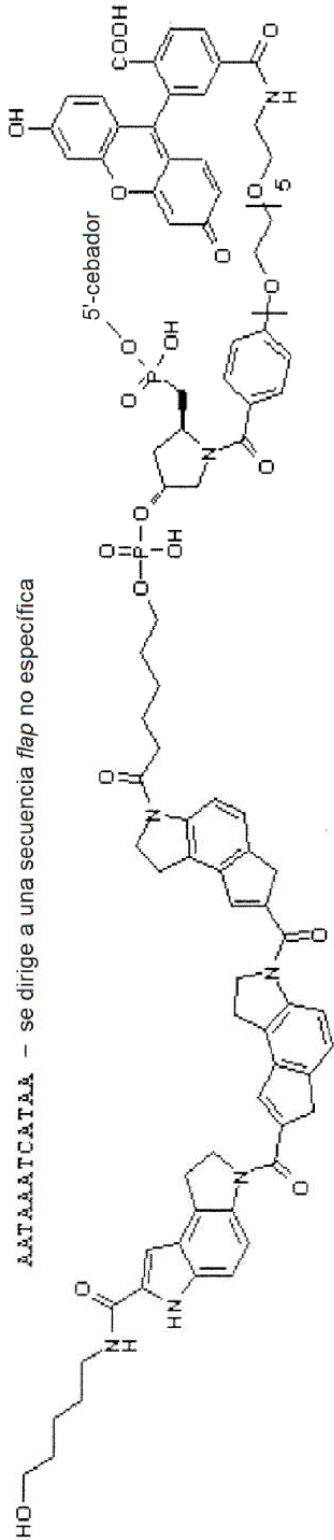


Figura 15

cebador directo	secuencia (5'-3')	mal apareamiento	Tm (65/95oC)	Ct
ADV-25	GGCCCGAGATC (dI) C (dI) ATGTA	dI/A, dI/C	59, 5	26
ADV-26	GGCCCGAGATC (dI) GC (dI) TGTA	dI/A, dI/T	63, 7	25, 5
ADV-27	GGCCCGAGATC (dI) GCA (dI) GTA	dI/A, dI/A	66, 1	27
ADV-28	GGCCCGAGATC (dI) GCAT (dI) TA	dI/A, dI/C	65, 4	24
ADV-13	GGCCCGAGATC (I04) G (I04) ATGTA	I04/A, I04/C	58, 6	28
ADV-14	GGCCCGAGATC (I04) GC (I04) TGTA	I04/A, I04/T	64, 7	25
ADV-15	GGCCCGAGATC (I04) GCA (I04) GTA	I04/A, I04/A	66, 2	26
ADV-16	GGCCCGAGATC (I04) GCAT (I04) TA	I04/A, I04/C	66, 0	24
ADV-17	GGCCCGAGATC (I07) G (I07) ATGTA	I07/A, I07/C	62, 1	27
ADV-18	GGCCCGAGATC (I07) GC (I07) TGTA	I07/A, I07/T	66, 6	24
ADV-19	GGCCCGAGATC (I07) GCA (I07) GTA	I07/A, I07/A	67, 3	25
ADV-20	GGCCCGAGATC (I07) GCAT (I07) TA	I07/A, I07/C	66, 6	23
ADV-29	GGCCCGAGATGTCATC (dI) A	dI/A	68, 3	34
ADV-30	GGCCCGAGATGTCATGT (dI)	dI/T	68, 4	32
ADV-21	GGCCCGAGATGTCATC (I04) A	I04/A	68, 6	42
ADV-22	GGCCCGAGATGTCATGT (I04)	I04/T	68, 6	nada
ADV-23	GGCCCGAGATGTCATC (I07) A	I07/A	68, 6	37
ADV-24	GGCCCGAGATGTCATGT (I07)	I07/T	68, 6	43
ADV-32	GGCCCGAG (dI) TG (dI) GC (dI) TGTA	dI/A, dI/T, dI/T	58, 5	30
ADV-31	GGCCCGAGA (dI) G (dI) GC (dI) TGTA	dI/A, dI/T, dI/A	61, 0	31
ADV-34	GGCCCGAG (I04) TG (I04) GC (I04) TGTA	I04/A, I04/T, I04/T	61, 4	28
ADV-33	GGCCCGAGA (I04) G (I04) GC (I04) TGTA	I04/A, I04/T, I04/A	62, 9	26
ADV-36	GGCCCGAG (I07) TG (I07) GC (I07) TGTA	I07/A, I07/T, I07/T	63, 9	24
ADV-35	GGCCCGAGA (I07) G (I07) GC (I07) TGTA	I07/A, I07/T, I07/A	65, 4	24

Figura 15

Figura 16

	secuencia (5' - 3')	mal apareamiento	Ct (56°C)	Ct (56°C)
LGA-L23	GTATATTTCCGTTATTTTCTAAAGCACT	ninguno	35	33
LGA-L24	GTATA (dI) TTCCGTTA (dI) TT (dI) CT (dI) A (dI) GC ACT	3xdI/A, 2xdI/T	42	ninguno
LGA-L25	GTATA (I07) TTCCGTTA (I07) TT (I07) CT (I07) A (I07) GCACTG	3xI07/A, 2xI07I/T	36	36

LGA-E3	AATAAATCATAAGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACC (cebador en exceso)	1,260 μM
LGA-FAM5	MGB-FAM-G*ATAAA*AT*T*T*GTA*TA*GG-EDQ (sonda de detección)	0,200 μM

G* es Super G, A* es Super A, T* es Super T
MGB - ligante de surco menor,
FAM - 6-Carboxifluoresceína
EDQ - inactivador Eclipse Dark

Figura 17

Secuencias de los productos de la PCR generados a partir de cebadores de inosina:

Secuencia objetivo (las regiones del cebador se muestran en cursiva; la base de T que se va a sustituir en el cebador se muestra en negrita):

Cebadores en 5' *ACATgaggat***ttt***gtatatttccg***ttat***tctaaagcactg*TATATTGATAAAAATTTGTAT
AGggtt*tactag***tat***cctcgcc*AT

Cebadores:

cebador natural F 5' GAGGATTTTGTATATTTCCGTTA**TTT**TCTAAAGCACTG 3'

cebador F (I01) 5' GAGGATTTTGTATATTTCCGTTA **(dI)** TT **(dI)** CTAAAGCACTG 3'

cebador F (I07) 5' GAGGATTTTGTATATTTCCGTTA **(I07)** TT **(I07)** CTAAAGCACTG 3'

en las que (dI) es inosina

Resultados de la secuenciación del amplicón:

cebador Natural F (hebra inversa):

3' CAGTGCTTTAG**AAA**ATAACGGAAATATACAAAATCCTC 5'

Amplicón complementario del cebador F (dI):

3' CAGNGCTTTAG**CAAC**TAACGGAAATATACAAAANNCTC 5'

Amplicón complementario del cebador F (I07):

3' CANNCTTTAG**CAAC**TAACGGAAANATACAAAATCCTN 5'