

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 938**

51 Int. Cl.:

C07H 19/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2009 PCT/US2009/044910**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151921**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2009 E 09763212 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2294076**

54 Título: **Nucleósidos 5'-trifosfatos modificados químicamente para replicación de ácido nucleico iniciada térmicamente**

30 Prioridad:

27.05.2008 US 56324

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

21.07.2017

73 Titular/es:

**TRILINK BIOTECHNOLOGIES (100.0%)
9955 Mesa Rim Road
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**LEBEDEV, ALEXANDRE V. y
KOUKHAREVA, INNA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 625 938 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

Nucleósidos 5'-trifosfatos modificados químicamente para replicación de ácido nucleico iniciada térmicamente

Campo de la invención

5 En el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones para replicación de ácido nucleicos. En ciertos aspectos en particular, los procedimientos y composiciones son para replicación de ácido nucleico de arranque/inicio en caliente (*hot start*) (a temperaturas elevadas).

Antecedentes de la invención

Se proporciona la siguiente descripción para ayudar al lector en su comprensión.

Ninguna información facilitada o citada como referencia se admite como técnica anterior de la presente invención.

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) probablemente sea el procedimiento más extendido en la biología molecular moderna y la biotecnología y se está aplicando con rapidez para realizar ensayos genéticos, diagnósticos, estudios forenses y biodefensa. Kolmodin, L.A. y col., *Nucleic Acid Protocols Handbook*, 569-580 (Rapley, R. ed., Humana Press 2000); Budowle, B. y col., *301 Science*, 1852-1853 (2003); Sato y. y col., *5 (Suppl. 1) Legal Medicine*, S191-S193 (2003); Saldanha, J. y col., *43 J. Medical Virol.*, 72-76 (1994); Dahiya, R. y col., *44 Biochemistry and Molecular Biology International*, 407-415 (1998); y Elnifro, E.M. y col., *13 Clin. Microbiol. Rev.*, 559-570 (2000). La PCR se describe en las patentes estadounidenses Nos. 4.683.195 y 4.683.202. En cada ciclo del proceso de amplificación por PCR, normalmente, hay varias etapas. Primero se desnaturaliza térmicamente la secuencia diana de ADN de doble cadena a temperaturas elevadas (~95 °C). El primer episodio de desnaturalización se denomina en el presente documento "etapa de desnaturalización inicial." Ello va seguido del emparejamiento de un cebador oligonucleótido sintético con cada una de las cadenas a temperaturas más bajas (~60°C). A continuación, estos cebadores de oligonucleótido de orientación directa e invertida se extienden desde sus términos 3' a una temperatura elevada (~70°C) mediante ADN polimerasa dependiente de ion magnesio, térmicamente estable que incorpora 2'-desoxirribonucleósido 50-trifosfatos (dNTP) y genera pirofosfato (PPi).

25 La utilidad de la PCR viene dada por su capacidad para proporcionar de forma rápida amplificaciones ~10⁶-veces mayores de la diana además de una alta especificidad, que depende en parte de la especificidad de la hibridación del cebador oligonucleótido. Las secuencias y longitud de cebador oligonucleótido están diseñadas por tanto para hibridarse únicamente con la secuencia diana que se pretende, a las temperaturas utilizadas para el emparejamiento. Sin embargo, las reacciones de amplificación por PCR se preparan normalmente durante un período de minutos o de horas a temperaturas ambiente, que están bastante por debajo del intervalo de temperatura necesario para asegurar la especificidad de la hibridación del cebador oligonucleótido. En estas condiciones de preparación de muestra tan poco rigurosas y tras una etapa de desnaturalización previa a la PCR inicial, es posible que cebadores oligonucleótido se unan no específicamente a otras secuencias e inicien potencialmente la síntesis de productos de extensión no deseados que se pueden amplificar con la secuencia diana. La amplificación de secuencias diana no específicas que tienen complementariedad parcial con los cebadores, denominada "cebado erróneo" puede competir con la amplificación de las secuencias diana deseadas y puede disminuir significativamente la eficacia de la amplificación de la secuencia deseada, específicamente para dianas de un bajo número de copias. (Chou, Q. y col., *20 Nucleic Acids Res.* 1717-1723 (1992)).

40 La formación de "dímeros de cebadores" es otra forma de hibridación no específica problemática que, de acuerdo con Chou, Q. y col., tiene como resultado la amplificación de dos cebadores oligonucleótido extendidos a través de sus respectivas secuencias sin secuencia intercalada significativa. Estas investigaciones han señalado además que los dímeros de cebador pueden experimentar oligomerización amplificada durante la PCR para crear una mezcla compleja de artefactos de cebador de oligonucleótido, cuya cantidad y calidad varía a menudo inversamente al rendimiento del producto de PCR específico en amplificaciones de un bajo número de copias.

45 Si bien los problemas que se han mencionado como consecuencia del cebado erróneo y la formación de dímero de cebador se pueden encontrar en todas las aplicaciones de PCR, ambas cuestiones suponen un especial reto en los esquemas de PCR analítica de alta sensibilidad, tales como los que se utilizan para la detección de agentes infecciosos transmitidos por la sangre (Saldanha, J. y col.; Elnifro, E.M. y col.), microbios biopeligrosos (Budowle, B. y col.), genes defectuosos o cancerosos (Dahiya, R. y col.) y estudios forenses (Budowle, B. y col.; Y. Sato y col.). Por otra parte, existe una posibilidad mucho mayor de que se formen productos de amplificación espurios en PCR multiplex. Markoulatos, P. y col., *16 J. of Clin. Laboratory Analysis*, 47-51 (2002). En la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), el medio más sensible para la detección de una secuencia de ARN diana es el uso de un cebador oligonucleótido específico de gen en la etapa de RT, Zhang, J. y col., *337 Biochem. J.*, 231-241 (1999); Lekanne Deprez, R.H. y col., *307 Analytical Biochem.*, 63-69 (2002); Bustin, S.A. y col., *15 J. of Biomolecular Techniques*, 155-166 (2004). En vista de la importancia de estas aplicaciones de alta sensibilidad que requieren una alta especificidad para evitar consecuencias adversas serias de "falsos negativos" y "falsos positivos," es crucial contar con reactivos y protocolos que proporcionen ensayos que carezcan funcionalmente de artefactos como consecuencia de cebados erróneos y formación de dímero de cebador.

- Se ha investigado una serie de estrategias generales para reducir la amplificación no específica basadas en el llamado procedimiento "hot start" que tiene como objeto dañar la amplificación no deseada debido a un cebado erróneo y la formación de dímero de cebador oligonucleótido en condiciones de poca rigurosidad, p.ej. a temperatura ambiente durante la preparación de muestra y tras una etapa de desnaturalización previa a la PCR inicial. La amplificación comienza posteriormente cuando la mezcla de reacción alcanza una alta rigurosidad, es decir, temperaturas "calientes" (hot) para "iniciar" (start) la extensión mediada por polimerasa de cebadores oligonucleótido hibridados únicamente con secuencias diana. Por lo tanto, la temperatura desencadena la extensión enzimática de cebadores oligonucleótido únicamente a temperaturas elevadas cuando la rigurosidad de las condiciones de hibridación cebador/diana es óptima para la especificidad.
- Estas estrategias generales para "hot start" incluye el uso de (1) materiales sensibles a la temperatura, tales como ceras, como barreras o agentes secuestrantes para controlar el mezclado de los reactivos (Chou, Q. y col.; Tanzer, L.R. y col., 273 Analytical Biochem., 307-310 (1999)); (2) oligonucleótidos aptámeros (Dang, C. y col., 264 J. Mol. Biol., 268-278 (1996)) o anticuerpos (Eastlund, E. y col., 2 LifeScience Quarterly, 2-5 (2001); Mizuguchi, H. y col., 126 J. Biochem. (Tokio), 762-768 (1999)) que inhiben la función de ADN polimerasas; (3) uso de una segunda enzima termoestable, como pirofosfatasa (Clark, D.R. y col., Solicitud de Patente Internacional No. WO 2002088387) para eliminar la supresión mediante pirofosfato añadido (PPi); (4) polimerasas químicamente modificadas con reactivos hidrolíticamente reversibles, tales como lisina modificada con ácido citracónico (Birch, D.E. y col., patente estadounidense No. 5.773.258) en AmpliTaq Gold (Moretti, T. y col., 25 BioTechniques, 716-722 (1998); Saldanha, J. y col.); (5) construcciones de secuencia de cebador oligonucleótido que desfavorecen el cebado erróneo a baja temperatura, como por ejemplo secuencias competidoras (Puskas, L.G. y col., 5 Genome Research, 309-311 (1995)) o "cebadores oligonucleótido touch up e incorporados en bucle" (TULIPS-PCR) (Ailenberg, M. y col., 29(5) BioTechniques, 1018-1023 (2000)); y (6) cebadores modificados químicamente que contienen unione(s) de fosfotriéster entre nucleótidos próximo al extremo 3' del cebador (es decir cebadores fosfotriéster) (Zon, G. y col., Solicitud de Patente Estadounidense No. 20070281308 (2007)).
- WO 02/29003 A2 se refiere a un procedimiento para secuenciar un ácido nucleico detectando la identidad de un análogo de nucleótido después de incorporar el análogo de nucleótido en una cadena en crecimiento de ADN en una reacción de polimerasa. El análogo de nucleótido comprende un grupo químico segmentable que remata con caperuza la posición 3', grupo que tras la incorporación del análogo de nucleótido en la cadena en crecimiento se separa de la posición 3' a través de un medio seleccionado del grupo que consiste en uno o más entre un medio físico, un medio químico, un medio físico-químico, calor y luz.
- Las referencias que se dan a continuación, se refieren también a procedimientos para secuenciar un ácido nucleico utilizando NTP que llevan sustituyentes en 3' que tienen el efecto de actuar como nucleótidos terminadores. Los NTP se incorporan mediante la polimerasa durante la reacción de secuenciación y posteriormente se eliminan para regenerar un 3'-OH libre extendible con la polimerasa:
- A. Földesi y col., "The fluoride cleavable 2-(cyanoethoxy)methyl (CEM) group as reversible 3'-O-terminator for DNA sequencing-by-synthesis - synthesis, incorporation y cleavage" (Nucleosides, Nucleotides y Nucleic Acids, Vol. 26, No. 3, páginas 271-275, 2007)
- J. Wu y col., "3'-O-modified nucleotides as reversible terminators for pyrosequencing" (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., Vol. 104, No. 42, páginas 16462-16467, 2007)
- Ju Jingyue y col., "Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators" (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., Vol. 103, No. 52, páginas 19635-19640, 2006)
- B. Canard y col., "DNA polimerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags" (Gene 148, páginas 1-6, 1994)
- WO 96/23807 A1
- US 2008/0103058 A1
- US 2007/0166705 A1
- WO 2007/002204 A2
- La patente estadounidense US 5.763.594 A se refiere a un procedimiento para la creación gradual de uniones fosfodiéster entre nucleósidos deseados con el resultado de la síntesis *de novo* de polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótido predeterminada. El procedimiento comprende la preparación de una sustancia de iniciación que contiene un grupo 3'-hidroxilo sin modificar y libre; la unión de un mononucleótido seleccionado con el 3'-hidroxilo del sustrato de iniciación, en el que el mononucleótido contiene un grupo 3'-hidroxilo protegido, seguido de la desprotección y adición del siguiente nucleótido entrante.
- WO 2007/139723 A1 se refiere a procedimientos y composiciones para amplificación de ácido nucleico. Estos procedimientos implican el uso de ciertos cebadores oligonucleótido modificados en reacciones de amplificación de ácido nucleico dependientes de la temperatura.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento de replicación de ácidos nucleicos tal como se define en la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes se refieren a modos de realización de la misma en particular.

5 El procedimiento de replicación de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención comprende la replicación de ácido nucleico en un medio de reacción de replicación, comprendiendo dicho medio de reacción de replicación al menos un NTP y un tampón de reacción, en el que dicho al menos un NTP añadido a dicho tampón de reacción comprende un grupo de sustitución en 3' térmicamente lábil y en el que dicha replicación va precedida de una inducción térmica mediante la incubación de dicho medio de reacción de replicación a 50 °C-100 °C.

10 En el presente documento, se proporcionan procedimientos y composiciones para replicación de ácido nucleico. Dichos procedimientos implican el uso de nucleósido 5'-trifosfatos (NTP), cebadores oligonucleótido y enzima en reacciones de replicación de ácido nucleico dependientes de matriz de ácido nucleico. Los procedimientos se llevan a cabo mediante el uso de NTP modificados, que son útiles en la replicación de ácido nucleico. Los NTP modificados tienen una sustitución en 3', es decir, un grupo distinto a un grupo hidroxilo en la posición 3' terminal. El uso de dichos NTP en los procedimientos es para replicación de ácido nucleico, en particular, para replicación de ácido nucleico hot start. En ciertos modos de realización, la sustitución en 3' de los NTP la presente invención daña la extensión de cebador oligonucleótido mediada por polimerasa antes del período de incubación inicial a una temperatura elevada de la replicación de ácido nucleico, como por ejemplo en la etapa de desnaturalización inicial de la PCR. En ciertos aspectos y modos de realización, se proporcionan procedimientos y composiciones en los que el grupo de sustitución en 3' de los NTP, tal como se desvela en el presente documento, se convierte en un grupo 3'-hidroxilo (3'-OH) abierto durante o después de la etapa de inducción térmica inicial de la replicación de ácido nucleico y, en los casos en que sea aplicable, durante posteriores ciclos de replicación.

25 En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos en los que se replica ácido nucleico (p.ej. ADN), en los que se añade al menos un NTP modificado a una reacción de replicación que tiene una sustitución en 3' tal como se desvela en el presente documento. Preferentemente, la sustitución en 3' de al menos un NTP modificado daña o impide (p.ej. en algunos modos de realización, preferentemente, un ácido nucleico polimerasa es capaz de incorporar y extender NTP sin sustituir o naturales y no es capaz de incorporar ni extender NTP 3'sustituidos) la extensión de cebador oligonucleótido mediada por polimerasa antes del período de incubación inicial, es decir, la temperatura de desnaturalización inicial de la replicación de ácido nucleico, como por ejemplo 80-105 °C durante 1 para RT-PCR. En ciertos modos de realización preferentes, la sustitución en 3' daña la incorporación mediada por ácido nucleico polimerasa de un NTP 3' sustituido con un cebador oligonucleótido, impidiendo así la extensión en 3' del cebador. Este tipo de NTP 3' sustituido representa un "NTP no sustrato." En otros modos de realización preferentes determinados, un NTP 3'-sustituido puede incorporarse en el extremo 3' de un cebador oligonucleótido y el grupo de sustitución en 3' daña entonces cualquier otra extensión medida por ácido nucleico polimerasa del cebador oligonucleótido. Este tipo de NTP 3' sustituido representa un "NTP de terminación".

35 En la bibliografía se han descrito grupos protectores termolábiles adecuados para los grupos de modificación de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento (p.ej. sustituciones en 3' y uniones entre nucleótidos) para su uso en el procedimiento de síntesis de oligonucleótido. Véase, p.ej. Grajkowski y col., 3 Org. Lett., 1287-1290 (2001); Wilk, A. y col., 42 Tetrahedron Lett., 5635-5439 (2001); Wilk, A. y col., 67 J. Org. Chem., 6430-6438 (2002); Cieslak, J. y col., 68 J. Org. Chem., 10123-10129 (2003); Cieslak, J. y col., 69 J. Org. Chem., 2509-2515 (2004); Beaucage y col., patente estadounidense No. 7.355.037; y Beaucage y col., patente estadounidense No. 6.762.298.

45 Se han desarrollado diversas aplicaciones basadas en el uso de NTP y nucleósido difosfatos (NDP) sustituidos en 3' Jeng y col., 3 J. Supramol. Struct., 448-468 (1975) han descrito la síntesis de análogos de ATP 3'-arilizado y su uso como marcadores de fotoafinidad para miosin ATPasa. Se han preparado y sometido a ensayo compuestos similares en otros sistemas ATPasa (Schafer y col., 87 FEBS Lett., 318-322 (1978); Lunardi y col., 20 Biochemistry, 473-480 (1981)). Hiatt y col., patente estadounidense No. 6.232.465 y las patentes de referencia describe nucleósido 5'-trifosfatos protegidos en 3' para la creación independiente de matriz, catalizada por enzima, de enlaces fosfodiéster para su uso en la síntesis de oligonucleótido. Tras la formación del enlace fosfodiéster, se puede eliminar químicamente el grupo 3'-protector del nucleótido incorporado y se puede continuar la síntesis del oligonucleótido. Otro uso de NTP 3'-sustituidos es secuenciación por síntesis gradual. Cheeseman, patente estadounidense No. 5.302.509, describe NTP 3'-modificados que contienen un marcador fluorescente eliminable para secuenciación de polinucleótidos. Metzker y col., 22 Nucleic Acids Res., 4259-4267 (1994) describe la síntesis de NTP modificados con un grupo 3'-protector eliminable por UV como componente clave para el desarrollo de una nueva estrategia de secuenciación. Un enfoque similar incluye el uso de NTP marcados con colorante que contienen grupos protectores 3'-O-alilo y 3'-O-metoximetilo, tales como los desarrollados por Ju y col., patente estadounidense No. 6.664.079; Meng, Q. y col., 78 J. Org. Chem., 3248-3252 (2006); y Bi, L. y col., 128 J. Amer. Chem. Soc., 2542-2543 (2006)). El grupo 3'-O-alilo se puede eliminar mediante catalizador de paladio en solución acuosa neutra a temperatura elevada. Otras patentes describen también la síntesis y el uso de dNTP 3' sustituidos con un grupo de sustitución en 3' eliminable. Por ejemplo, el grupo 3'-bloqueante se puede eliminar añadiendo ácido clorhídrico a un pH 2 (p.ej., Tsien, R.Y., WO 91/06678); o añadiendo un agente de reducción como mercaptoetanol (p.ej., Kwiatkowski, M., patente estadounidense No. 7.279.563); o por adición de tris-(2-carboxietil)fosfina (p.ej., Milton, J. y

col, patente estadounidense No. 7.414.116). Ciertos grupos de sustitución en 3' se pueden eliminar por irradiación UV (p.ej., Dower y col., WO 92/10587). Se han descrito grupos de sustitución en 3' eliminables para oligonucleótidos (p.ej., Bi, W., WO 08/016562 (A2)).

5 En el presente documento se desvelan composiciones (es decir NTP 3' sustituidos) que incluyen las fórmulas químicas representadas en las Fórmulas IA y IB más adelante en el presente documento. En ciertos aspectos, se proporcionan procedimientos en los que se replica ADN utilizando composiciones que incluyen las fórmulas químicas representadas en las Fórmulas IA y 1B que se describen más adelante en el presente documento; y utilizando oligonucleótidos que incluyen al menos una unidad de monómero derivada de la incorporación de un NTP 3'-sustituido que incluye las fórmulas químicas representadas en las Fórmulas IA y IB.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "NTP no sustrato" se refiere a un NTP 3'-sustituido que tiene una sustitución en 3' que no tiene capacidad de incorporar un cebador oligonucleótido (Fig. 1A). Un NTP no sustrato de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento tiene dos estados. El NTP no sustrato está en un estado inactivo debido a la presencia de un grupo de sustitución en 3' y no es un sustrato para ácido nucleico polimerasa (Fig. 1 A). Una vez alcanzada una temperatura de desnaturalización inicial, generalmente 95 °C, un NTP no sustrato inactivo se puede convertir para pasar a un estado activo por conversión
15 intra- y/o intermolecular térmicamente inducida del grupo de sustitución en 3' o a través de otra reacción química que tenga como resultado la conversión del grupo de sustitución en 3' en un grupo 3'-OH sin modificar o abierto. Este estado activo del NTP no sustrato es el NTP sin sustituir en 3' o natural correspondiente o un derivado funcional del mismo, que posee un grupo 3'-OH abierto o sin sustituir y puede ser un sustrato para ácido nucleico polimerasa y soporta la replicación de ácido nucleico (Figuras 1 y 2). En los modos de realización preferentes en particular, la conversión parcial o completa del grupo de sustitución en 3' tiene lugar durante la incubación a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 1-120 minutos. En algunos modos de realización, los NTP sustituidos en 3', tal como se desvela en el presente documento, pueden utilizarse en combinación con otro u otros procedimientos hot start y una o más composiciones conocidas dentro de la técnica, como el uso de materiales sensibles a la temperatura, como ceras, como barreras o agentes secuestrantes, para controlar el mezclado de los reactivos; oligonucleótidos aptámeros o anticuerpos que inhiben la función de ADN polimerasa; uso de una segunda enzima termoestable como por ejemplo pirofosfatasa para eliminar la supresión de pirofosfato añadido (PPI); polimerasas químicamente modificadas con reactivos hidrolíticamente reversibles, como lisina modificada con ácido citracónico; construcciones de secuencia de cebador oligonucleótido, que desfavorecen el cebado erróneo a baja temperatura, como por ejemplo secuencias competidoras; y cebador químicamente modificado que contiene unione(s) fosfotriéster entre nucleótidos próximas al extremo 3' del cebador (es decir, cebadores fosfotriéster). En modos de realización preferentes, la conversión del grupo de sustitución en 3' tiene lugar en relación con la temperatura y no requiere enzimas, sustancias químicas adicionales, o condiciones de reacción de polimerización modificadas diferentes a las utilizadas normalmente en las reacciones de replicación con dNTP normales. Los diferentes grupos de sustitución en
30 3' para nucleósidos y nucleótidos de las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento se describen por ejemplo en Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., Protective grupos in organic synthesis, John Wiley & Sons, Inc. (1999).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "NTP de terminación" se refiere a un NTP 3'-sustituido que se puede incorporar en el extremo 3' de un cebador oligonucleótido (Figura 1B). Como resultado de la incorporación del NTP de terminación, se forma un cebador terminado y se impide el posterior alargamiento del cebador. Un NTP de terminación tiene dos estados y en ambos estados es un sustrato para ácido nucleico polimerasa. El NTP de terminación está en un estado de terminación debido a la presencia de un grupo de sustitución en 3'. La incorporación de un NTP de terminación en el extremo 3' de un cebador tiene como resultado la formación de un cebador terminado alargado (N+1) e impide que el cebador se siga extendiendo (Figura 1B). A temperaturas elevadas, como 95 °C, el NTP de terminación puede transformarse a un estado activo por eliminación intra- y/o intermolecular inducida térmicamente del grupo de sustitución 3' o a través de otra reacción química que tenga como resultado la conversión del grupo de sustitución en 3' en un grupo 3'-OH sin modificar o abierto (Fig. 1B). En este estado, el NTP de terminación se convierte en el NTP natural o sin sustituir correspondiente, o un derivado funcional el mismo que posee un grupo 3'-OH sin sustituir o abierto y puede ser un sustrato para ácido nucleico polimerasa. En modos de realización particularmente preferentes, la conversión parcial o completa del grupo de sustitución en 3' tiene lugar durante la incubación a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 1-120 minutos. En modos de realización preferentes, la conversión del grupo de sustitución en 3' tiene lugar en relación con la temperatura y no requiere enzimas, sustancias químicas adicionales o condiciones de reacción de polimerización modificadas distintas a las utilizadas normalmente en reacciones de replicación con los dNTP convencionales. En Greene, T.W. y col., por ejemplo, se describen diferentes grupos de sustitución en 3' para nucleósidos y nucleótidos de las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento.

En el caso de que un ácido nucleico polimerasa incorpore un NTP de terminación en el extremo 3' de un cebador, el NTP de terminación pasa a formar parte de un cebador alargado (N+1) que se denomina "cebador terminado". El cebador terminado no puede seguir alargándose y permanece en un "estado terminado" debido a la presencia de un grupo de sustitución en 3' en su término, en la última unidad de nucleótido 3' originada desde el NTP de terminación incorporado, hasta que se alcanza una alta temperatura, generalmente 95 °C. Este estado de terminación para un cebador terminado es equivalente al estado inactivo definido en el presente documento para un NTP no sustrato. En un modo de realización preferente, un cebador terminado incluye una modificación adicional, por ejemplo, un resto

de nucleósido modificado con azúcar modificada, base, unión entre nucleótidos (5'3) o cualquier combinación de los mismos además de contener un grupo de sustitución en 3'. Más preferentemente, un cebador terminado contiene un grupo de sustitución en 3' térmicamente lábil. Una vez alcanzada una alta temperatura (p.ej. la temperatura de desnaturalización inicial de la PCR), el cebador terminado puede pasar a ser un cebador extendible por fragmentación intra- y/o intermolecular inducida térmicamente que elimina el grupo de sustitución en 3' (Figuras 1B y 2). El "cebador extendible" posee un grupo 3'-OH sin sustituir o abierto y es capaz de alargarse con ácido nucleico polimerasa. En modos de realización particularmente preferentes, tiene lugar la conversión completa o parcial del grupo de sustitución en 3' tras la incubación a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 1-120 minutos. En modos de realización preferentes, la conversión del grupo de sustitución en 3' del cebador terminado tiene lugar en relación con la temperatura y no requiere enzimas, sustancias químicas adicionales o condiciones de reacción de polimerización modificadas diferentes a las utilizadas normalmente en replicaciones con dNTP convencionales.

En un modo de realización preferente, se pueden marcar uno o más de los componentes de una mezcla de reacción de polimerización de NTP, como por ejemplo NTP 3'-sustituido, NTP modificado, NTP sin modificar, o una combinación de los mismos, presentes en la reacción de polimerización, con un marcador detectable. De este modo, tras la replicación, se puede identificar el segmento diana, por ejemplo, por el tamaño, la masa, por captura por afinidad o por el color. El marcador detectable es preferentemente un colorante fluorescente, el marcador de captura por afinidad es preferentemente biotina.

En otro aspecto, los procedimientos y composiciones del presente documento proporcionan NTP 3' sustituidos para replicación de ácido nucleico, incluyendo un NTP que tiene uno o más grupos de modificación. Los NTP 3'-sustituidos pueden incluir una o más de las estructuras químicas representadas en las Fórmulas IA y IB que se describen más adelante en el presente documento.

En otro aspecto más, los procedimientos y composiciones del presente documento proporcionan procedimientos de síntesis de NTP 3'-sustituidos, tal como se desvela en el presente documento.

En el presente documento se describen kits que incluyen NTP 3'-sustituidos para realizar replicación.

Por ejemplo, los kits pueden contener reactivos de PCR para dianas de replicación corrientes tales como genes constitutivos. El kit que contiene un NTP 3'-sustituido puede incluir un recipiente etiquetado para replicación de ácido nucleico, instrucciones para realizar la replicación de ácido nucleico y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en cebadores modificados, cebadores sin modificar, NTP modificados (p.ej. NTP 3'-sustituidos), NTP sin modificar, ácido nucleico polimerasa, cloruro de magnesio u otro catión divalente (p.ej. magnesio y manganeso) y tampón de reacción. En un ejemplo, el kit incluye NTP 3'-sustituidos, ácido nucleico polimerasa y al menos una enzima adicional (p.ej. una segunda ácido nucleico polimerasa, transcriptasa inversa, ligasa o enzima de restricción) y puede incluir componentes de tampón adicionales adecuados para al menos una enzima adicional. Preferentemente, el kit incluye dos o más reactivos de replicación de ácido nucleico, preferentemente tres o más y más preferentemente cuatro más. El kit que contiene un NTP 3'-sustituido puede incluir también cebadores oligonucleótido. En un ejemplo, los cebadores oligonucleótido están modificados, p.ej., teniendo cualquier sustitución o modificación en las uniones entre nucleótidos, azúcares de nucleósido, cadena de trifosfato y/o bases de nucleósido. Los kits pueden incluir un recipiente etiquetado para replicación de ácido nucleico, instrucciones para realizar la replicación de ácido nucleico y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en dNTP, ácido nucleico polimerasa, magnesio y tampón de reacción.

Los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento para replicación de ácido nucleico son útiles en aplicaciones en las que se emplean NTP sintéticos y/o naturales, cebadores oligonucleótido modificados, cebadores oligonucleótido sin modificar y polimerasa para extensión de ácido nucleico. Los NTP de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento pueden tener una sola sustitución en 3' o pueden tener opcionalmente sitios de modificación adicionales.

Los NTP 3'-sustituidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento suponen significativas ventajas. Por ejemplo, un usuario final puede utilizar los mismos protocolos y procedimientos de replicación que se están utilizando ya con los NTP sin sustituir convencionales. Los NTP 3'-sustituidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento son compatibles con los sistemas y reactivos de replicación existentes (incluyendo diversos procedimientos de PCR hot start); no se necesitan enzimas o reactivos adicionales, pero se pueden utilizar. Se pueden utilizar procedimientos de síntesis química y enzimática convencionales para sintetizar los NTP 3'-sustituidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento. Con NTP 3'-sustituidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento se pueden utilizar aplicaciones de replicación basadas en polimerasa que requieren fidelidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "replicación", "amplificación" o "amplificar" se refiere a los procedimientos conocidos en la técnica para copiar un ácido nucleico diana, aumentado en virtud de ello el número de copias de una secuencia de ácido nucleico seleccionada. La replicación y la amplificación en la que participan las composiciones y procedimientos que proporciona el presente documento pueden emplear cebadores y/o NTP 3'-sustituidos con extensión de ácido nucleico polimerasa. La replicación o amplificación del ácido nucleico diana puede ser exponencial, no lineal o lineal. Preferentemente, la replicación o amplificación es exponencial o no lineal.

Un ácido nucleico diana puede ser ADN, ARN, ADNc o una matriz de ácido nucleico modificada. Si bien los procedimientos a modo ilustrativo que se describen más adelante en el presente documento se refieren a la amplificación por PCR, en la técnica se conocen otros muchos procedimientos adecuados para los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento para amplificación enzimática y reproducción de ácidos nucleicos. Por ejemplo, otros procedimientos de replicación y amplificación enzimática incluyen procedimientos isotérmicos, replicación en círculo rodante, PCR hot-start, PCR en tiempo real, PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje o ensamblaje de ciclos de polimerasa (PCA), PCR asimétrica, PCR de colonias, PCR en emulsión, PCR rápida, PCR en tiempo real, ligamiento de ácido nucleico, Reacción en cadena de la ligasa Gap (Gap LCR), PCR mediada por ligasa, Amplificación de Sonda dependiente de ligandos múltiples (MLPA), PCR de ligamiento de Extensión Gap (GEXL-PCR), PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), PCR multiplex.

PCR específica intersecuencial (ISSR) PCR, PCR inversa, PCR lineal después de exponencial (LATE-PCR), PCR específica de metilación (MSP), PCR anidada, PCR de extensión solapada, ensayo PAN-AC, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), amplificación rápida de extremos ADNc (RACE PCR), amplificación de una sola molécula (SMA PCR), PCR térmica de entrelazado asimétrico, PCR touchdown, PCR larga, transcripción, transcripción inversa, duplicación y otras reacciones de extensión de ácido nucleico conocidas en la especialidad. Las personas especializadas en la técnica entenderán que es posible el uso de otros procedimientos ya sea en lugar de, o en combinación con, los procedimientos de PCR, incluyendo reacciones de replicación enzimática que se desarrollen en el futuro. Véase, p.ej. Saiki, "Amplification of Genomic DNA" in PCR Protocols, Innis y col., eds., Academic Press, San Diego, CA, 13-20 (1990); Wharam y col., 29(11) Nucleic Acids Res, E54-E54 (2001); Hafner y col., 30(4) Biotechniques, 852-6, 858, 860 passim (2001); Ross, P. y col., Solicitud de patente internacional No. WO 91/06678; Kwiatkowski, M., patentes estadounidenses Nos. US 6.255.475, US 6.309.836 y US 6.639.088 y patente europea EP1218391; Anazawa, T. y col., patente estadounidense No. 6242193; Ju y col., patente estadounidense No. US 6.664.079; Tsien, R.Y. y col., Solicitud de patente internacional No. WO 91/06678; y Dower y col., Solicitud de patente internacional No. WO 92/10587.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "secuencia de nucleótido" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento de los mismos y ribo- o desoxiribo- derivados y moléculas naturales o sintéticas que contienen restos de nucleótido naturales y/o modificados y uniones entre nucleótidos. Estas expresiones se refieren también a ADN o ARN de origen natural (p.ej. genómico) o sintético que pueden ser monocatenarios, bicatenarios, tricatenarios o tetracatenarios y pueden representar la cadena codificante o no codificante, o a cualquier material de tipo ADN o de tipo ARN. Un "equivalente de ARN" en referencia a una secuencia de ADN, se compone de la misma secuencia lineal de nucleótidos que la secuencia de ADN de referencia, con la excepción de que todos o la mayoría de las apariciones de la base nitrogenada timina están sustituidas por uracilo y la cadena principal del azúcar está compuesta de ribosa en lugar de 2'-desoxirribosa. Otras cadenas principales de ácido nucleico alternativas adecuadas para los procedimientos y composiciones que proporciona el presente documento incluyen, pero sin limitarse sólo a ellas, fosforotioato, fosforoselenoato, fosfotriéster de alquilo, fosfotriéster de arilo, fosfonato de alquilo, fosfonato de arilo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos de péptido (PNA) y fosfoboronato. El ARN se puede utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento y/o puede convertirse a ADNc por transcripción inversa para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "NTP 3'-sustituido" se refiere a un nucleósido 5'-trifosfato que tiene un grupo fracción química distinto a un grupo hidroxilo abierto en la posición 3'. El NTP 3'-sustituido incluye por ejemplo, un NTP que contiene un azúcar modificado, una base o una cadena trifosfato, o cualquier combinación de azúcar modificado, base o cadena trifosfato, tal como se presenta por ejemplo en las Fórmulas IA y IB que se describen más adelante en el presente documento. Se pueden encontrar ejemplos de dichos NTP, por ejemplo en "Nucleoside Triphosphates and Their Analogs: Chemistry, Biotechnology y Biological Applications," Vaghefi, M., ed., Taylor y Francis, Boca Ratón (2005); Metzker, M.L. 15 Genome Research 1767-1776 (2005) (y las referencias facilitadas en dicho documento).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "cebador", "oligonucleótido" o "cebador oligonucleótido" se refieren a un ribo- o desoxiribopolinucleótido, normalmente monocatenario, de origen natural o sintético y normalmente incluye una secuencia de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos o más preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden contener uno o más grupos de modificación. Los oligonucleótidos pueden incluir ADN, ARN, PNA, LNA y/u otros nucleósidos modificados. Las personas especializadas en la técnica serán capaces de diseñar y preparar cebadores que sean apropiados para la replicación de una secuencia diana. La longitud de la secuencia de hibridación de cebadores para su uso en los procedimientos y composiciones que proporciona el presente documento depende de diversos factores, entre los que se incluyen la identidad de la secuencia de nucleótidos y la temperatura a la que se hibridan o se utilizan dichos ácidos nucleicos durante la replicación de ácido nucleico *in vitro*. Las consideraciones necesarias para determinar una longitud preferente para la secuencia de hibridación del cebador de un cebador con una identidad de secuencia en particular son muy conocidas entre las personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido corto puede estar relacionada con su especificidad o selectividad de hibridación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “cebador terminado” se refiere a un cebador, un cebador oligonucleótido que contiene un grupo de sustitución en 3' incorporado por incorporación mediada por ácido nucleico polimerasa de un NTP de terminación en el extremo 3' del cebador. El cebador terminado, que puede incluir uno o más grupos de modificación adicionales de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento, no puede alargarse antes de la conversión del grupo de sustitución en 3' a un grupo 3'-OH abierto. El cebador terminado puede incluir ADN o ARN nucleósidos naturales, nucleósidos modificados o análogos de nucleósidos que contienen uniones fosfodiéster entre nucleótidos o modificaciones de los mismos, o una combinación de los mismos. Preferentemente, un grupo de sustitución en 3' es térmicamente lábil y se disocia del cebador terminado a una mayor velocidad a medida que se eleva la temperatura del medio de reacción de replicación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “cebador extendible” se refiere a un cebador o cebador oligonucleótido que contiene un grupo 3'-OH abierto o sin modificar y que se puede extender mediante la incorporación mediada por ácido nucleico polimerasa de un NTP en el extremo 3' del cebador. El cebador extendible puede ser el cebador de partida original o puede ser un cebador terminado transformado en el que se ha convertido un grupo de sustitución en 3' en un grupo 3'-OH libre.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “grupo de sustitución en 3'” se refiere a una fracción química en la posición 3' de un NTP o cebador distinto a un grupo hidroxilo (3'-OH) abierto o sin modificar. En ciertos modos de realización, la fracción química es un éter, éster o carbonato. En ciertos modos de realización preferentes, el grupo de sustitución en 3' se selecciona del grupo que consiste en O-(p-toluen)sulfonato; O-fosfato; O-nitrato; O-[4-metoxi]tetrahidropiraniolo; O-[4-metoxi]-tetrahidrotiopiraniolo; O-tetrahidrotiopiraniolo; O-[5-metil]-tetrahidrofuranilo; O-[2-metil,4-metoxi]-tetrahidropiraniolo; O-[5-metil]-tetrahidropiraniolo; O-tetrahidropiraniolo; O-tetrahidrofuranilo; O-fenoxiacetilo; O-metoxiacetilo; O-acetilo; O-C(O)-OCH₃; O-C(O)-CH₂CH₂CN; y O-C(S)-OCH₃. En algunos modos de realización preferentes en particular, el grupo de sustitución en 3' se selecciona del grupo que consiste en O-metoxitetrahidropiraniolo; O-tetrahidropiraniolo; y O-tetrahidrofuranilo.

Los NTP sustituidos en 3' de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento no tienen preferentemente ninguna eficacia o una eficacia reducida para extensión de oligonucleótido o ácido nucleico. Preferentemente, se considera dañada la extensión cuando un NTP sustituido en 3' es al menos 50 % menos eficaz como sustrato en una reacción de replicación en comparación con su NTP sin sustituir en 3' correspondiente, preferentemente al menos 60 % menos eficaz, preferentemente al menos 70 % menos eficaz, más preferentemente al menos 80 % menos eficaz, más preferentemente al menos 90 % menos eficaz, más preferentemente al menos 95 % menos eficaz, más preferentemente al menos 99 % menos eficaz siendo lo más preferente 100% menos eficaz como sustrato en una reacción de replicación con respecto al NTP no sustituido en 3' correspondiente. Las personas especializadas en la técnica serán capaces de determinar fácilmente el nivel de actividad de sustrato y la eficacia de los NTP. En el Ejemplo 4 se ilustra un procedimiento para determinar la eficacia del sustrato. En ciertos modos de realización preferentes, los grupos de sustitución en 3' son termolábiles y se disocian desde un NTP sustituido en 3' a una mayor velocidad a medida que se eleva la temperatura del medio de reacción de replicación.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones “no sustituido en 3'”, “natural” o “sin modificar” dentro del contexto de los NTP y los cebadores oligonucleótido se refiere a NTP y cebadores oligonucleótido sin grupo de modificación o equivalente funcional de un NTP o cebador oligonucleótido sin un grupo de modificación.

Además del grupo de sustitución en 3', un NTP 3'-sustituido o un cebador 3'-sustituido puede contener uno o más grupos de modificación adicionales. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “grupo de modificación” se refiere a cualquier fracción química que se puede unir a un NTP o un cebador en emplazamientos que incluyen, pero sin limitarse solo a ellos, el fosfato, azúcar, cadena de trifosfato o fracciones de base nucleósido. El grupo de modificación de un NTP o cebador puede ser un grupo de cualquier naturaleza compatible con el proceso de replicación de ácido nucleico. El grupo de modificación puede ser un grupo lábil que se disocia desde un NTP modificado o cebador modificado a una mayor velocidad a medida que se eleva la temperatura del medio de reacción enzimática. En un modo de realización, el grupo de modificación del cebador modificado presente en la reacción de polimerización puede estar presente en una unión entre nucleótidos, p.ej., tal como se describe en la Solicitud de patente estadounidense No. 20070281308. En otro modo de realización, el grupo de modificación de un NTP o cebador modificado presente en la reacción de polimerización puede ser un marcador detectable. De este modo, tras la replicación, se puede identificar el segmento diana por el tamaño, la masa, por captura por afinidad y/o por el color. El marcador detectable es preferentemente un colorante fluorescente; el marcador de captura por afinidad es preferentemente biotina.

Tal como se utiliza en el presente documento, la palabra “término” en relación con un oligonucleótido se refiere a los nucleótidos en el extremo 3' o 5' de un oligonucleótido. Preferentemente, el término de un oligonucleótido incluye los 6 nucleótidos terminales, más preferentemente los 5 nucleótidos terminales, más preferentemente, los 4 nucleótidos terminales, más preferentemente, los 3 nucleótidos terminales, más preferentemente los 2 nucleótidos terminales, o más preferentemente el nucleótido terminal.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos “convertir” “disociar” “disociación” o “fragmentación” se refieren a la eliminación o transformación de un grupo de modificación (p.ej. por eliminación o transformación de un

grupo de sustitución en 3' por un grupo 3'-OH), desde un NTP o cebador. La eliminación o transformación de un grupo de modificación puede ser parcial, p.ej. en los casos en los que el grupo de sustitución en 3' se disocia desde una fracción de moléculas modificadas, o completa, en los casos en los que el grupo de sustitución en 3' desde todas las moléculas modificadas. En ciertos modos de realización preferentes, la eliminación o transformación de un grupo de modificación en la posición 3' tiene como resultado la formación de un grupo 3'-OH abierto en la posición 3' del NTP o cebador. La eliminación o transformación de un grupo de modificación puede tener lugar por reacción intramolecular o por reacción con otra molécula. Preferentemente, la eliminación o transformación de un grupo de sustitución en 3' convierte un NTP 3'-sustituido al estado activo y un cebador terminado en un cebador extendible.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unión entre nucleótidos" se refiere a un enlace o enlaces que conectan dos nucleósidos de un cebador oligonucleótido o ácido nucleico y puede ser una unión fosfodiéster natural o una unión modificada.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diana" o las expresiones "secuencia de ácido nucleico diana" o "diana de ácido nucleico" se refieren a una secuencia de nucleótidos que se ha de identificar.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcador" o "marcador detectable" se refiere a cualquier compuesto o combinación de compuestos que puede unirse o asociarse de otro modo con una molécula, de manera que la molécula puede detectarse directamente o indirectamente detectando el marcador. Un marcador detectable puede ser un radioisótopo (p.ej. carbono, fósforo yodo, indio, azufre, tritio, etc.), un isótopo de masa (p.ej. H², C¹³ o N¹⁵), un colorante o fluoróforo (p.ej. cianina, fluoresceína o rodamina), un hapteno (p.ej. biotina) o cualquier otro agente que se pueda detectar directamente o indirectamente. Tras la incorporación de un NTP marcado en un amplicón u otro producto de polimerización, se puede detectar el marcador.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "inducción térmica" o "conversión térmica" se refieren a procedimientos a través de los cuales se aplica calor para eliminar o transformar el grupo de sustitución en 3' de un NTP 3'-sustituido, en virtud de lo cual se genera un sustrato adecuado para ácido nucleico polimerasas. La expresión inducción térmica o conversión térmica se refieren también a procedimientos a través de los cuales se aplica calor para eliminar o transformar el grupo de sustitución en 3' de un cebador terminado que genera un cebador extendible fabricando de este modo un sustrato para ácido nucleico polimerasas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hot start" se refiere a una reacción de replicación de ácido nucleico en la que se daña la replicación de ácido nucleico mediada por polimerasa hasta que la reacción alcanza una temperatura deseada, que es preferentemente una temperatura inicial por encima de la temperatura de extensión óptima de la enzima. En las aplicaciones de PCR hot start, las temperaturas iniciales alcanzan entre aproximadamente 80 y 105 °C; o al menos 80 °C, o al menos 85 °C, o al menos 90 °C, o aproximadamente 94 °C, o aproximadamente 95 °C, o aproximadamente 96 °C, o aproximadamente 100 °C. Preferentemente, la PCR "hot start" requiere que la ácido nucleico polimerasa y todos los demás componentes de la PCR se añadan antes de la etapa de desnaturalización inicial. El término hot start es muy conocido dentro de la técnica y existe una serie de procedimientos conocidos para dañar la replicación, tales como polimerasas modificadas, oligonucleótidos con estructuras secundarias que dañan la hibridación u oligonucleótidos con modificaciones químicas que dañan la extensión y reactivos contenidos en barreras sensibles a la temperatura, como cera. En un modo de realización preferente, la amplificación hot start se inicia por conversión inducida por calor de un grupo de sustitución en 3' en un NTP no sustrato, un NTP de terminación o un cebador terminado en un grupo 3'-OH abierto.

Tal como se utiliza en el presente documento, "cebado erróneo" se refiere a una iniciación no específica de la extensión de cebador mediada por ácido nucleico polimerasa. En particular, se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que tienen un determinado grado de no complementariedad con el cebador y que potencialmente inician la síntesis de productos de extensión no deseados, que se pueden amplificar junto con la secuencia diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "estado inactivo" o "inactivo" dentro del contexto de un NTP se refieren a un NTP no sustrato con un grupo de sustitución en 3'. En un modo de realización, la unión del grupo de sustitución en 3' con el NTP lo hace inactivo y daña la incorporación del NTP 3'-sustituido en un cebador oligonucleótido, impidiendo así la extensión en 3' mediante ácido nucleico polimerasa (Figura 1A). Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "estado de terminación" en el contexto de un NTP de terminación se refiere a un NTP 3'-sustituido capaz de incorporarse en el extremo 3' de un cebador para formar un cebador extendido N+1 inextensible (es decir, cebador terminado) (Fig. 1B).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "estado de terminación" en el contexto de un cebador, se refiere a un cebador que contiene un grupo de sustitución en 3' en el extremo 3' (Figura 1B). En un modo de realización, la incorporación del NTP de terminación 3'-sustituido en el extremo 3' del cebador causa una terminación temporal de la extensión del cebador. El cebador terminado resultante no soporta las reacciones de replicación de ácido nucleico y no puede seguir extendiéndose hasta que el grupo de sustitución en 3' se convierte en un grupo 3'-OH abierto.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "estado activo" o "activo" en el contexto de un NTP, se refieren a un NTP que puede ser un sustrato para polimerasa. Preferentemente, un NTP "activo" no tiene una

sustitución en 3' o puede tener un NTP de terminación que contiene un grupo de sustitución en 3' convertido. Preferentemente, un NTP activo tiene un grupo 3'-OH sin modificar o puede servir como sustrato para ácido nucleico polimerasa en reacciones de replicación. Un NTP en estado activo puede ser un NTP que nunca ha tenido una sustitución en 3' o un NTP en el que se ha convertido, eliminado o transformado una sustitución en 3'.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "dímero(s) de cebador" se refiere a un producto(s) de extensión de cebador oligonucleótido no específico que es el resultado de la amplificación de dos cebadores oligonucleótido extendidos hibridados a través de sus secuencias entre sí pero sin secuencia intercalada significativa.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "se hibrida" o "se hibrida específicamente" se refieren a un proceso en el que dos cadenas de ácido nucleico complementarias se emparejan entre sí en condiciones rigurosas apropiadas. Las hibridaciones con ácido nucleico diana se llevan a cabo normalmente y preferentemente con moléculas de ácido nucleico de longitud de sonada, preferentemente 20-100 nucleótidos de longitud. Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son muy conocidas en la especialidad. Véase, p.ej., Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); Ausubel, F.M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. (1994).

15 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación que no permiten la hibridación de dos ácidos nucleicos que no son completamente complementarios.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra" o "muestra de ensayo" se refiere a un material líquido o sólido que contiene supuestamente el ácido nucleico de interés. Una muestra de ensayo se puede obtener a partir de cualquier fuente biológica (es decir, una muestra biológica), tales como células en cultivo o una muestra de tejido o una muestra producida sintéticamente incluyendo una matriz químicamente sintetizada.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "complemento", "complementario" o "complementariedad" en el contexto de un oligonucleótido o polinucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos, como por ejemplo, cebadores oligonucleótido o un ácido nucleico diana) se refiere a las reglas de apareamiento de base Watson/Crick convencionales. Una secuencia complemento también puede ser una secuencia de ADN o ARN complementaria con la secuencia de ADN o su secuencia complemento y puede ser también un ADNc. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-C-3'" es complementaria de la secuencia "3'-T-C-A-G-5'." En los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento se pueden incluir ciertos nucleótidos que no se encuentran comúnmente en ácidos nucleicos naturales o que se sintetizan químicamente; entre ellos se incluyen pero sin limitarse a ellos, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados con azúcar y base, como inosina, 7-deazaguanosina, 2'-O-metilguanósina, 2'-fluoro-2'-deoxicitidina, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y péptido ácido nucleico (PNA). La complementariedad no tiene por qué ser perfecta; los bicatenarios estables pueden contener pares de bases apareados erróneamente, nucleótidos degenerativos o desapareados. Las personas especializadas en la técnica de la tecnología de ácidos nucleicos podrán determinar la estabilidad bicatenaria de forma empírica teniendo en cuenta una serie de variables, entre las que se incluyen por ejemplo la longitud del oligonucleótido, la composición de la base y la secuencia del oligonucleótido, la incidencia de pares de bases apareados erróneamente, la concentración iónica, así como otros componentes y condiciones de tampón de hibridación.

40 La complementariedad puede ser "parcial", en la que solamente algunas de las bases de nucleótido de la cadena de ácidos nucleicos se aparean de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. La complementariedad puede ser completa o total en los casos en los que se aparean las bases de nucleótido de las dos cadenas de ácido nucleico de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. La complementariedad puede estar ausente en los casos en los que ninguna de las bases de nucleótido de las dos cadenas de ácido nucleico se aparea de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia y fuerza de hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Esto reviste una particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos. Los términos se pueden utilizar también en referencia a nucleótidos individuales, especialmente dentro del contexto de polinucleótidos. Por ejemplo, puede señalarse un nucleótido en particular dentro de un oligonucleótido en cuanto a su complementariedad, o falta de ella, con un nucleótido dentro de otra cadena de ácido nucleico, en contraste o comparación con la complementariedad entre el resto del oligonucleótido y la cadena de ácido nucleico.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustancialmente complementario" se refiera a dos secuencias que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. Las personas especializadas en la técnica entenderán que las secuencias sustancialmente complementarias no tienen por qué hibridarse a lo largo de toda su longitud. En particular, una secuencia sustancialmente complementaria comprende una secuencia contigua de bases que no se hibridan con una secuencia diana, situada en 3' o 5' para una secuencia contigua de bases que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cebador directo" se refiere a un cebador oligonucleótido que se empareja con una cadena no codificante de un ARN monocatenario, ADN monocatenario o ADN bicatenario.

Un "cebador inverso" se empareja con la cadena codificante del ARN monocatenario, ADN monocatenario o ADN bicatenario.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un cebador oligonucleótido es "específico" para un ácido nucleico si la secuencia de hibridación de cebador oligonucleótido del cebador oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con una porción del ácido nucleico en los casos en los que el cebador oligonucleótido y el ácido nucleico están alineados. Un cebador oligonucleótido que es específico para un ácido nucleico es aquel que, en condiciones de hibridación o lavado apropiadas, es capaz de hibridarse con la diana de interés y no hibridarse sustancialmente con las secuencias de ácido nucleico que no son de interés. Son preferentes niveles de identidad de secuencia más altos e incluyen al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % y más preferentemente 100 % de identidad de secuencia.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "nucleósido" incluye todos los nucleósidos de origen natural, incluyendo todas las formas de bases de nucleósidos y furanosidos encontrados en los ácidos nucleicos naturales. Los anillos de base que se encuentran más comúnmente en los nucleósidos de origen natural son anillos de purina y pirimidina. Los anillos de purina de origen natural incluyen por ejemplo adenina, guanina y N⁶-metiladenina. Los anillos de pirimidina de origen natural incluyen por ejemplo citosina, timina y 5-metilcitosina. Los nucleósidos de origen natural incluyen por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, ribo- y 2'-desoxirribo- derivados de adenosina, guanosina, citidina, timidina, uridina, inosina, 7-deazaguanosina, 7-metilguanina.

15 Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "análogos de nucleósido" "nucleósidos modificados" o "derivados de nucleósido" incluyen, nucleósidos sintéticos, tal como se describen en el presente documento. Los derivados de nucleósido incluyen también nucleósidos que tienen fracciones modificadas con azúcar y/o base, con o sin grupos protectores. Dichos análogos incluyen por ejemplo, 2'-desoxi-2'-fluorouridina, 2'-Ometiluridina y similares. Los compuestos y procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen dichos anillos de bases y análogos sintéticos de los mismos, así como azúcares de bases sustituidos heterocíclicos no naturales, e incluso azúcares de bases sustituidas acíclicos. Asimismo, los derivados de nucleósido incluyen otros derivados de purina y pirimidina, por ejemplo, purinas sustituidas con halógeno (p.ej. 6-fluoropurina), pirimidinas sustituidas con halógeno, N⁶-etiladenina, N⁴-(alquil)-citosinas, 5-etilcitosina y similares. Los derivados de nucleósido y análogos abarcan una amplia variedad de modificaciones, tales como las que se describen en la patente estadounidense No. 6.762.298.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "NTP de base universal", "NTP de base degenerada", "análogo de NTP de base universal" y "análogo de NTP de base degenerada" incluyen por ejemplo un análogo de NTP con una base artificial reconocible preferentemente por ácido nucleico polimerasa como sustituto para cualquier NTP específico, como por ejemplo dATP, ATP, dTTP, dUTP, dCTP, CTP, dGTP, GTP y otros NTP específicos. También se pueden utilizar los NTP con bases universales o bases degeneradas y se pueden encontrar ejemplos de ellos en Loakes, D., 29 Nucleic Acids Res. 2437-2447 (2001); Crey-Desbiolles, C. y col., 33 Nucleic Acids Res. 1532-1543 (2005); Kincaid, K. y col., 33 Nucleic Acids Res. 2620-2628 (2005); Preparata, FP, Oliver, JS, 11 J. Comput. Biol. 753-765 (2004); y Hill, F. y col., 95 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 4258-4263 (1998).

25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "oligonucleótido modificado" incluye, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un nucleósido modificado, una unión entre nucleótidos modificada, o que tiene cualquier combinación de nucleósidos y uniones entre nucleótidos modificadas (incluso si solamente están presentes nucleósidos naturales en la cadena de nucleótidos). Se pueden encontrar ejemplos de unión entre nucleótidos de oligonucleótidos, por ejemplo, en Waldner y col., 6 Bioorg. Med. Chem. Letters 2363-2366 (1996). Entre los ejemplos de oligonucleótidos modificados se incluyen fosforotioato, fosfotriéster y metilfosfonato y se pueden encontrar por ejemplo en Stec, W.J. y col., 33 Chem. Int. Ed. Engl., 709-722 (1994); Lebedev, A.V. y col., E., 4 Perspect. Drug Discov. Des., 17-40 (1996); y Zon y col., Solicitud de patente estadounidense No. 20070281308. El término oligonucleótido modificado abarca oligonucleótidos que tienen una sustitución en 3' en el nucleótido 3' terminal.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "acilo" designa un grupo -C(O)R^a, en el que R^a es hidrógeno, alquilo inferior, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo y similares.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "acilo sustituido" designa el -C(O)R^a, en el que R^a es alquilo inferior sustituido, cicloalquilo sustituido, heterociclilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido y similares.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aciloxi" designa el grupo -OC(O)R^b, en el que R^b es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y similares.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alcano" se refiere a un compuesto orgánico que incluye átomos de carbono y átomos de hidrógeno e incluye enlaces C-H e incluye adicionalmente enlaces simples C-C en alcanos distintos a metano. El término "alcano" incluye alcanos de cadena lineal, como por ejemplo alcanos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. En algunos modos de realización, los alcanos incluyen alcanos de cadena lineal, tales como alcanos que tienen de 1 a 8 átomos de carbono como metano, etano, propano, butano, pentano,

hexano, heptano y octano. El término "alcano" incluye también alcanos de cadena ramificada como por ejemplo, pero sin limitarse sólo a ellos alcanos de cadena ramificada que tienen de 1 a 20 y, en algunos modos de realización de 1 a 8 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, 2-metilpropano, 2,2-dimetilpropano, 2-metilbutano, 2,3-dimetilbutano, 2,2-dimetilbutano, 2-metilpentano, 3-metilpentano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, 2,2-dimetilpentano, 3,3-dimetilpentano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,2-dimetilhexano, 2,3-dimetilhexano, 2,4-dimetilhexano, 2,5-dimetilhexano, 3,3-dimetilhexano, 3,4-dimetilhexano, 2-metilheptano, 3-metilheptano, 4-metilheptano, 3-etilpentano, 3-etil-2-metilpentano, 3-etilhexano y similares. Un enlace C-C o C-H de un alcano puede estar reemplazado por un enlace de otro grupo, como por ejemplo, un grupo hidroxilo, un halógeno, como F, Cl, Br, o I, o un grupo sulfhidrilo o un grupo amina. Los alcanos reemplazados por dichos grupos pueden denominarse respectivamente hidroxialcanos, haloalcanos, tales como fluoroalcanos, cloroalcanos, bromoalcanos yodoalcanos, mercaptoalcanos y aminoalcanos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a un hidrocarbilo de cadena lineal o cadena ramificada, que tiene uno o más enlaces dobles y, a no ser que se especifique de otro modo, contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono, siendo lo más preferente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Entre los ejemplos de radicales alquenilo se incluyen vinilo, alilo, 1,4-butadienilo, isopropenilo y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquenilarilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquenilo y "alquenilarilo sustituido" se refiere a grupos alquenilarilo que llevan uno o más sustituyentes tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquenileno" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada divalentes que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono y que contienen normalmente de 2 a 20 átomos de carbono, preferentemente 2-12 átomos de carbono, preferentemente 2-8 átomos de carbono y "alquenileno sustituido" se refiere a grupos alquenileno que llevan además uno o más sustituyentes tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburos de enlace simple que oscila normalmente entre 1 y 20 átomos de carbono, preferentemente 1-8 átomos de carbono, entre los ejemplos se incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo y similares. Entre los ejemplos de dichos radicales alquilo se incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, hexilo, octilo, dodecanilo y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo inferior" se refiere a hidrocarburos de cadena lineal o cadena ramificada normalmente en un intervalo comprendido entre 1-6 átomos de carbono, preferentemente 2-5 átomos de carbono. Entre los ejemplos se incluyen etilo, propilo, isopropilo y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquileno" se refiere a un hidrocarbilo divalente que contiene 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-15 átomos de carbono, de cadena lineal o ramificada, de la que dos átomos de hidrógeno están tomados del mismo átomo de carbono o de átomos de carbono diferentes. Entre los ejemplos de alquileno se incluyen, sin limitarse solo a ellos, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-) y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a un hidrocarbilo de cadena lineal o cadena ramificada, que tiene uno o más enlaces triples y contiene aproximadamente 2-20 átomos de carbono, preferentemente aproximadamente 2-10 átomos de carbono, más preferentemente aproximadamente 2-8 átomos de carbono, siendo lo más preferente aproximadamente 2-6 átomos de carbono. Entre los ejemplos de radicales alquinilo se incluyen etinilo, propinilo (propargilo), butinilo y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquinarilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquinilo y "alquinarilo sustituido" se refiere a grupos alquinarilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alcoxi" designa el grupo -OR^c, en el que R^c es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, heteroalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, o cicloheteroalquilo sustituido tal como se ha definido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alcoxi inferior" designa el grupo -OR^d, en el que R^d es alquilo inferior.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilarilo" se refiere a grupos arilo sustituidos con alquilo y "alquilarilo sustituido" se refiere a grupos alquilarilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilcarbonilamino" designa el grupo -NR^eC(O)R^f, en el que R^e es alquilo sustituido opcionalmente y R^f es hidrógeno o alquilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilsulfinilo" designa el grupo $-S(O)R^g$, en el que R^g es alquilo sustituido opcionalmente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilsulfonilo" designa el grupo $-S(O)_2R^g$, en el que R^g es alquilo sustituido opcionalmente.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilsulfonilamino" designa el grupo $-NR^eS(O)_2R^f$, en el que R^e es alquilo sustituido opcionalmente y R^f es hidrógeno o alquilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquiltio" se refiere al grupo $-S-R^h$, en el que R^h es alquilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquiltio sustituido" se refiere al grupo $-S-R^i$, en el que R^i es alquilo sustituido.

- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquinileno" se refiere a grupos hidrocarbilo divalentes de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un enlace triple carbono-carbono y que tienen normalmente aproximadamente 2-12 átomos de carbono, preferentemente aproximadamente 2-8 átomos de carbono y "alquinileno sustituido" se refiere a grupos alquinileno que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amido" designa el grupo $-C(O)NR^lR^j$, en el que R^l y R^j pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido.

- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amido sustituido" designa el grupo $-C(O)NR^kR^k$, en el que R^k y R^k son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido, siempre y cuando, sin embargo, al menos uno entre R^k y R^k no sea hidrógeno. R^kR^k en combinación con el nitrógeno pueden formar opcionalmente un anillo heterocíclico o heteroarilo sustituido

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amidino" designa el grupo $-C(-NR^m)NR^mR^m$, en el que R^m , R^m y R^m son independientemente hidrógeno o alquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amino" o "amina" designa el grupo $-NR^nR^n$, en el que R^n y R^n pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como se define en el presente documento. Una "amina divalente" designa el grupo $-NH-$. Una "amina divalente sustituida" designa el grupo $-NR-$ en el que R es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido.

- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amino sustituido" o "amina sustituida" designa el grupo $-NR^pR^p$, en el que R^p y R^p son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, siempre y cuando, sin embargo, al menos uno entre R^p y R^p no sea hidrógeno. R^pR^p en combinación con el nitrógeno pueden formar un anillo heterocíclico o heteroarilo sustituido opcionalmente.

- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilalquinilo" se refiere a grupos alquinilo sustituidos con arilo y "arilalquinilo sustituido" se refiere a grupos arilalquinilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aralquilo" se refiere un alquilo tal como se define en el presente documento, en el que un átomo de hidrógeno del alquilo está reemplazado por un arilo, tal como se define en el presente documento. Entre los ejemplos de radicales aralquilo se incluyen bencilo, fenetilo, 1-fenilpropilo, 2-fenilpropilo, 3-fenilpropilo, 1-naftilpropilo, 2-naftilpropilo, 3-naftilpropilo, 3-naftilbutilo y similares.

- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aróilo" se refiere a especies aril-carbonilo como benzóilo y "aróilo sustituido" se refiere a grupos aróilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilalquilo" se refiere a grupos alquilo sustituidos con arilo y "arilalquilo sustituido" se refiere a grupos arilalquilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

- 50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo", solo o en combinación, se refiere a fenilo, naftilo o heterocíclico aromático condensado opcionalmente con un cicloalquilo preferentemente de 5-7, más preferentemente 5-6, miembros de anillo y/o sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos o sustituyentes halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono- o di-sustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono- o N,N-di-sustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, o similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilcarbonilamino" designa el grupo $-NR^qC(O)R^r$, en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior o alquilo y R^r es arilo opcionalmente sustituido.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arileno" se refiere a grupos aromáticos divalentes que tienen normalmente de 6 hasta 14 átomos de carbono y "arileno sustituido" se refiere a grupos arileno que llevan además uno o más sustituyentes tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ariloxi" designa el grupo $-OAr$, en el que Ar es un arilo, o un grupo arilo sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilsulfonilamino" designa el grupo $-NR^qS(O)_2R^r$, en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior o alquilo y R^r es arilo opcionalmente sustituido.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "grupo carbamato" designa el grupo $-O-C(O)-NR_2$, en el que cada R es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, tal como se indica en el presente documento.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "grupo ditiocarbamato" designa el grupo $-S-C(S)-NR_2$, en el que cada R es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, tal como se indica en el presente documento.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carbociclo" se refiere a un grupo aromático saturado o insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados compuestos de átomos de carbono unidos. El (los) anillos puede(n) estar opcionalmente sin sustituir o sustituidos con p.ej. halógeno, alquilo inferior, alcoxi, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, hetarilo, hetarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquenilo" se refiere a grupos que contienen anillo cíclico que contienen de 3-20 átomos de carbono y que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono y "cicloalquenilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquenilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo monocíclico o policíclico que contiene 3-15 átomos de carbono y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilenilo" se refiere a grupos que contienen anillo divalentes que contienen aproximadamente 3-12 átomos de carbono y "cicloalquilenilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilenilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "guanidinilo" designa el grupo $-N=C(NH_2)_2$ y "guanidinilo sustituido" designa el grupo $-N=C(NR_2)_2$, en el que cada R es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, tal como se indica en el presente documento.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" se refiere a todos los halógenos, es decir, cloro (Cl), flúor (F), bromo (Br) y yodo (I).

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a una estructura de anillo aromático monocíclico que contiene 5 o 6 átomos de anillo, o un grupo aromático bicíclico que tiene de 8 a 10 átomos, que contiene uno o más, preferentemente 1-4, más preferentemente 1-3, incluso más preferentemente 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente del grupo O, S y N y sustituido opcionalmente con 1-3 grupos o sustituyentes entre halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, aciloxi, ariloxi, heteroariloxi, amino opcionalmente mono- o di-sustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono- o N,N-di-sustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, o similares. Se pretende que heteroarilo incluya también S o N oxidados, como por ejemplo sulfinilo, sulfonilo y N-óxido de nitrógeno de anillo terciario. Un átomo de carbono o nitrógeno es el punto de unión de la estructura de anillo heteroarilo, de manera que se retiene un anillo aromático estable. Entre los ejemplos de grupos heteroarilo se incluyen ftalimida, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, quinazolinilo, purinilo, indolilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, tienilo, isoxazolilo, oxatiadiazolilo, isotiazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, triazinilo, furanilo, benzofurilo, indolilo y similares. Un heteroarilo sustituido contiene un sustituyente unido a un

50 carbono o nitrógeno disponible para producir un compuesto estable.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo sustituido" se refiere a un heterociclo opcionalmente mono o poli sustituido con uno o más grupos funcionales, p.ej., halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, heterociclo sustituido, hetarilo, sustituido hetarilo, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilcarbonilamino" designa el grupo $-NR^qC(O)R^r$, en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior y R^r es arilo opcionalmente sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroariloxi" designa el grupo $-OHet$, en el que Het es un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilsulfonilamino" designa el grupo $-NR^qS(O)_2R^s$, en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior y R^s es heteroarilo opcionalmente sustituido.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heterociclo" se refiere a un grupo aromático, saturado o insaturado que tiene un solo anillo (p.ej., morfolino, piridilo o furilol) o múltiples anillos condensados (p.ej., naftiridilo, quinoxalilo, quinolinilo, indolizínilo o benzo[b]tienilo) y que tienen átomos de carbono y al menos un heteroátomo, como N, O o S, dentro del anillo que puede estar opcionalmente sin sustituir o sustituido p.ej. con halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio, acetileno, amino, amido, carboxilo, hidroxilo, arilo, ariloxi, heterociclo, hetarilo, hetarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfamido y similares.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustituido heterociclo" se refiere a un heterociclo sustituido con 1 o más sustituyentes, p.ej., 1, 2, o 3, seleccionados del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, aciloxi, arilo, arilo sustituido, ariloxi, heteroariloxi, amino, amido, amidino, urea opcionalmente sustituida con grupos alquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente N-mono- o N,N-disustituido con grupos alquilo, arilo o heteroarilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilsulfonilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, acilo, carboxilo, heterociclo, heterociclo sustituido, hetarilo, hetarilo sustituido, nitro, ciano, tiol, sulfonamido y oxo, unido en cualquier punto disponible para producir un compuesto estable.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilo" se refiere a cualquier radical orgánico en el que la cadena principal del mismo comprende carbono e hidrógeno solamente. Por tanto, el hidrocarbilo abarca alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, arilalquenilo, alqueniloarilo, arilalquinilo, alquinilarilo y similares.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilo sustituido" se refiere a cualquiera de los grupos hidrocarbilo que se han referido que llevan además uno o más sustituyentes seleccionados entre, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, amino, alquilamino, alquilamino sustituido, carboxi, $-C(S)SR$, $-C(O)SR$, $-C(S)NR_2$, en el que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, nitro, ciano, halo, $-SO_3M$ o $-OSO_3M$, en el que M es H, Na, K, Zn, Ca, o meglumina, guanidinilo, guanidinilo sustituido, hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo sustituido, hidrocarbilarboniloxi, hidrocarbilarboniloxi sustituido, acilo, aciloxi, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilcarbonilo, heteroarilcarbonilo sustituido, carbamoilo, monoalquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, un grupo carbamato, un grupo ditiocarbamato, aroilo, aroilo sustituido, organosulfonilo, organosulfonilo sustituido, organosulfonilo, alquilsulfonilo sustituido, alquilsulfonilamino, alquilsulfonilamino sustituido, arilsulfonilamino, arilsulfonilamino sustituido, un grupo sulfonamida, sulfurilo y similares, incluyendo dos o más de los grupos descritos unidos a la fracción hidrocarbilo mediante dichas fracciones engarce/espaciador como $-O-$, $-S-$, $-NR-$, en el que R es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(=NR')-$, $-C(=CR'_2)-$, en el que R' es alquilo o alquilo sustituido, $-OC(O)-$, $-O-C(O)-O-$, $-O-C(O)-NR-$ (o $-NR-C(O)-O-$), $-NR-C(O)-$, $-NR-C(O)-NR-$, $-S-C(O)-$, $-S-C(O)-O-$, $-S-C(O)-NR-$, $-OS(O)_2-$, $-O-S(O)_2-O-$, $-O-S(O)_2-NR-$, $-O-S(O)-$, $-O-S(O)-O-$, $-O-S(O)-NR-$, $-O-NR-C(O)-$, $-O-NR-C(O)-O-$, $O-NRC(O)-NR-$, $-NR-O-C(O)-$, $-NR-O-C(O)-O-$, $-NR-O-C(O)-NR-$, $-O-NR-C(S)-$, $-O-NR-C(S)-O-$, $-O-NR-C(S)-NR-$, $-NR-OC(S)-$, $-NR-O-C(S)-O-$, $-NR-O-C(S)-NR-$, $-O-C(S)-$, $-O-C(S)-O-$, $-O-C(S)-NR-$ (o $-NR-C(S)-O-$), $-NR-C(S)-$, $-NRC(S)-NR-$, $-S-S(O)_2-$, $-S-S(O)_2-O-$, $-S-S(O)_2-NR-$, $-NR-O-S(O)-$, $-NR-O-S(O)-O-$, $-NR-O-S(O)-NR-$, $-NR-O-S(O)_2-$, $-NRO-S(O)_2-O-$, $-NR-O-S(O)_2-NR-$, $-O-NR-S(O)-$, $-O-NR-S(O)-O-$, $-O-NR-S(O)-NR-$, $-O-NR-S(O)_2-O-$, $-O-NR-S(O)_2-NR-$, $-O-NR-S(O)_2-$, $-O-P(O)R_2-$, $-S-P(O)R_2-$, o $-NR-P(O)R_2-$, en los que R es independientemente hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido y similares.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilo" designa grupos $-O$ -hidrocarbilo que contienen 2-20 átomos de carbono y "hidrocarbilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilarbonilo" se refiere a grupos $-C(O)$ -hidrocarbilo que contiene 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilarbonilo sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilarbonilo que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilarboniloxi" se refiere a grupos $-C(O)-O$ -hidrocarbilo que contiene 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilarboniloxi sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilarboniloxi que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilarboniloxi" se refiere a grupos $-O-C(O)$ -hidrocarbilo de 2-20 átomos de carbono e "hidrocarbilarboniloxi sustituido" se refiere a grupos hidrocarbilarboniloxi

que llevan además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrocarbilenos" se refiere a cualquier radical orgánico divalente, en el que la cadena principal del mismo comprende carbono e hidrógeno solamente. Por tanto, hidrocarbilenos abarca alquilenos, cicloalquilenos, alquilenos, cicloalquilenos, alquilenos, arilenos, alquilarilenos, arilalquilenos, arilalquilenos, alquilarilenos, arilalquilarilenos y similares, e "hidrocarbilenos sustituidos" se refiere a cualquiera de los grupos hidrocarbilenos referidos que lleva además uno o más sustituyentes, tal como se indica en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidroxilo" o "hidroxi" se refiere al grupo -OH.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "órganosulfínico" designa el grupo órgano -S(O)-, en el que órgano abarca fracciones alquilo, alcoxi, alquilamino y arilo, así como fracciones alquilo, alcoxi, alquilamino y arilo sustituidas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "organosulfónico" designa el grupo órgano -S(O)₂-, en el que órgano abarca fracciones alquilo, alcoxi y alquilamino, así como fracciones alquilo, alcoxi o alquilamino sustituidas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oxo" se refiere a un sustituyente oxígeno unido con doble enlace al carbono.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfínico" designa el grupo -S(O)-.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfínico sustituido" designa el grupo -S(O)R^t, en el que R^t es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterocicliclilalquilo, heterocicliclilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfónico" designa el grupo -S(O)₂-,

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfónico sustituido" designa el grupo -S(O)₂R^t, en el que R^t es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterocicliclilalquilo, heterocicliclilalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfonilamino" designa el grupo -NR^qS(O)₂- en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfonilamino sustituido" designa el grupo -NR^qS(O)₂R^u, en el que R^q es hidrógeno o alquilo inferior y R^u es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroaralquilo, heteroaralquilo sustituido, aralquilo, o aralquilo sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfurilo" designa el grupo -S(O)₂-,

Tal como se utiliza en el presente documento en conexión con los valores numéricos, el término "aproximativamente" o "aproximadamente" significa 30 % del valor indicado.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de dos mecanismos en los que se ilustra cómo se puede dañar la extensión del cebador mediada por ácido nucleico polimerasa con un dNTP 3'-sustituido antes de la activación Hot Start.

Las Figuras 2A y 2B son representaciones esquemáticas de esquemas ilustrativos para activación Hot Start inducida térmicamente. "X" representa un grupo de sustitución. La figura 2A muestra la conversión de dNTP 3'-sustituido que contiene un grupo 3'-X en un dNTP 3'-OH sin sustituir, en estado activo. La figura 2B muestra la conversión de "cebador terminado" que contiene un grupo de sustitución 3'-X en un cebador extendible sin sustituir.

La Figura 3 muestra la cinética de formación de dTTP desde dTTP 3'-sustituidos en tampón PCR buffer a 95° C.

La Figura 4 muestra los resultados de incorporación de dTTP sustituido con éter en 3' estimulada con ADN polimerasa de Klenow en experimentos de extensión de cebador con dTTP 3'-sustituidos sin calentar (arriba) y calentados previamente (abajo).

La Figura 5 muestra los resultados de un experimento de PCR Hot Start con varios derivados dTTP 3'-sustituidos en un sistema Lambda: análisis de electroforesis en gel (arriba) y representación gráfica de las relaciones entre

amplificón y productos fuera de diana (abajo).

La Figura 6 muestra los resultados de un experimento de PCR Hot Start con varios derivados dTTP 3'-sustituídos en un sistema VIH ADN: análisis de electroforesis en gel (arriba) y representación gráfica de las relaciones entre amplificón y productos fuera de diana (abajo).

5 La Figura 7 muestra el efecto combinado de dTTP 3'-THF sustituido y dATP en la eficacia de amplificación por PCR Hot Start de un fragmento VIH-1 de 365 pb: análisis de electroforesis en gel (arriba) y representación gráfica de las relaciones entre amplificón y productos fuera de diana (abajo).

Figura 8 es una representación gráfica de un enfoque de PCR de Ligamiento de extensión GAP de un tubo preferente (GEXL-PCR) utilizando dNTP 3'-sustituídos en combinación con cebadores fosfotriéster.

10 **Descripción detallada de la invención**

Una reacción de replicación de ácido nucleico, como PCR, implica (a) hibridación de un cebador oligonucleótido con un ácido nucleico diana seguido de (b) incorporación de nucleósido 5'-trifosfato (NTP) en un oligonucleótido mediante ácido nucleico polimerasa para formar al menos una copia, preferentemente, múltiples copias de una secuencia diana. No obstante, la reacción de replicación, a menudo rinde productos no deseados debido a un
15 cebado erróneo y la formación de dímero de cebador que afecta a la eficiencia y precisión del procedimiento y los posibles procedimientos dirección 3'. Muchos de los productos no deseados se producen durante la preparación de muestra y el aumento de temperatura inicial (etapa de desnaturalización inicial) de una reacción de replicación.

Los procedimientos y composiciones del presente documento proporcionan mejores procedimientos y composiciones para la replicación de ácido nucleico. En aspectos en particular, los procedimientos y composiciones conciernen al uso de NTP en reacciones de replicación de ácido nucleico dependientes de temperatura. En otros aspectos, el proceso de replicación de ácido nucleico emplea uno o más NTP 3'-sustituídos con un grupo de modificación termo-eliminable, preferentemente, en la posición 3' de un azúcar, cuya presencia daña la formación de productos de amplificación no deseados.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento de replicación de ácidos nucleicos utilizando al menos un NTP modificado, en el que el NTP modificado incluye uno o más grupos de modificación con al menos un grupo de sustitución en la posición 3'. En algunos modos de realización preferentes, el grupo de sustitución en la posición 3'- se convierte en grupo 3'-OH o se disocia del NTP durante la etapa desnaturalización inicial de la reacción de replicación. Por ejemplo, la etapa de desnaturalización inicial tiene lugar a aproximadamente 42-70 °C durante 10-100 minutos en una reacción de transcriptasa inversa y a aproximadamente 94 °C, 95 °C, 96 °C
30 o 100 °C durante 3-30 minutos para reacciones PCR. Las personas especializadas en la técnica podrán determinar los parámetros en los que tiene lugar la etapa de desnaturalización inicial sobre la base de la aplicación de replicación que se vaya a realizar con los NTP 3'-sustituídos proporcionados en el presente documento.

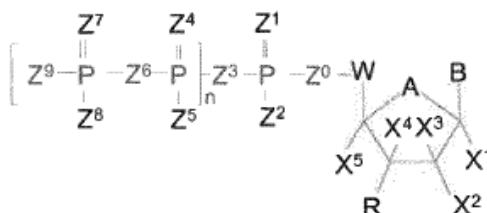
En el presente documento, los procedimientos y composiciones proporcionan un NTP 3'-sustituído, en el que el NTP posee uno o más grupos de modificación, en el que al menos una modificación es en la posición 3' (es decir un NTP 3'-sustituído). De acuerdo con un mecanismo el NTP 3'-sustituído es un NTP no sustrato y no puede ser utilizado como sustrato por ácido nucleico polimerasa (Figura 1A). Por lo tanto, el NTP 3'-sustituído no se incorpora en una cadena de oligonucleótidos o polinucleótidos hasta que se elimina el grupo de sustitución en 3' o se convierte si no en un grupo hidroxilo libre. En un segundo mecanismo, el NTP 3'-sustituído es un NTP de terminación y se puede incorporar mediante ácido nucleico polimerasa para alargar un cebador polinucleótido u oligonucleótido con una unidad de nucleósido modificada en la posición 3', produciendo un cebador terminado (Figura 1B). En consecuencia, se previene una posterior extensión del cebador terminado a no ser que se elimine o hasta que no se elimine el grupo de sustitución en 3' o se convierta si no en un grupo hidroxilo libre para generar un cebador extendible. Por lo tanto, la sustitución en 3' del NTP daña la extensión del cebador mediada por ácido nucleico polimerasa antes del período de incubación inicial a una temperatura elevada de replicación, como por ejemplo en la etapa de desnaturalización inicial de la PCR, que es preferentemente aproximadamente 95 °C durante 1-120 minutos. Una vez alcanzada la temperatura deseada, p.ej., altas temperaturas, el cebador terminado pasa a ser un cebador extendible por fragmentación intra y/o intermolecular inducida térmicamente que elimina el grupo de sustitución en 3' o convierte sino el grupo de sustitución en 3' en un grupo 3'-hidroxilo abierto (es decir, sin modificar). El cebador extendible que posee un grupo 3'-hidroxilo abierto (3'-OH) se puede alargar eficazmente mediante ácido nucleico polimerasa.
50

La conversión parcial (p.ej. de una fracción de todas las moléculas modificadas) o conversión completa (p.ej. de todas las moléculas modificadas) de los grupos de sustitución en 3' proporcionada en el presente documento en grupos 3'-hidroxilo tiene lugar preferentemente tras la incubación a aproximadamente 95 °C en 1-120 minutos, preferentemente en 1-30 minutos, preferentemente en 1-15 minutos, preferentemente en 1-10 minutos, más preferentemente en 1-5 minutos y más preferentemente en 1-2 minutos. En ciertos modos de realización, la conversión del NTP 3'-sustituído o el cebador terminado a un estado activo tiene lugar en relación con la temperatura y no requiere enzimas, sustancias químicas adicionales o condiciones de reacción de polimerización modificadas, pero se pueden utilizar conjuntamente. En ciertos modos de realización, la reacción de replicación no
55

5 incluye ninguna sustancia adicional. Entre los ejemplos de sustancias adicionales se incluyen, pero sin limitarse a ellas, compuestos químicos y enzimas. En modos de realización en particular, las sustancias adicionales no incluidas en una reacción de replicación son sustancias de segmentación química, como las empleadas en la técnica para eliminar los grupos de sustitución en 3' (p.ej. catalizador de paladio en solución acuosa neutra a temperatura elevada (véase p.ej., Ju y col., patente estadounidense No. 6.664.079; Meng, Q. y col. 78 J. Org. Chem., 3248-3252 (2006); y Bi, L. y col., 128 J. Amer. Chem. Soc., 2542-2543 (2006)), ácido clorhídrico a pH 2 (véase, p.ej., Tsien, R.Y, WO 91/06678) y agente de reducción, como mercaptoetanol (véase, p.ej., Kwiatkowski, M., patente estadounidense No. 7.279.563) o por adición de tris-(2-carboxietil)fosfina (véase p.ej., Milton, J. y col, Patente estadounidense No. 7.414.116). En modos de realización en particular, la eliminación del grupo de sustitución en 3' no es por irradiación UV (véase, p.ej., Dower y col., WO 92/10587). En algunos modos de realización, la reacción de replicación no incluye segmentación química del grupo de sustitución en 3' (p.ej. mediante enzima de segmentación).

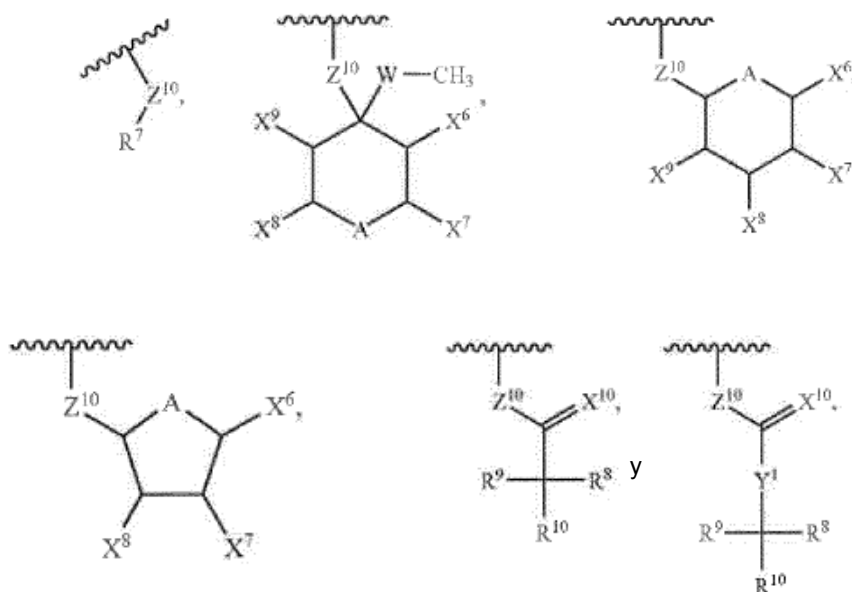
En otros modos de realización, la reacción de replicación no es secuenciación por síntesis gradual (p.je. replicación lineal de una secuencia diana).

15 En un aspecto, los NTP 3'-sustituídos utilizados en el procedimiento de acuerdo con la invención son compuestos que tienen la estructura de Fórmula IA:



en la que:

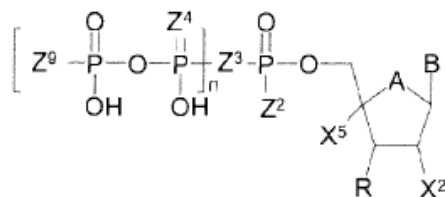
- n es 0 o 1;
- 20 B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o no-sustituida, cualquier derivado aza o deaza de la misma, o cualquier "base universal " o "base degenerada " de cualquier análogo de NTP, que es preferentemente reconocible por una ácido nucleico polimerasa;
- A se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
- 25 W se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
- cada R¹ y cada R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, C(Y)R⁵ y alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,
- en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; cada R³ y cada R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,
- 30 en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; cada R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, C(Y)R³ y alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,
- en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
- 35 Z¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
- Z⁴ y Z⁷ son cada uno O;
- Z⁰ y Z⁶ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹ y C(Y);
- 40 Z³ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, C(Y), un resto 3'-O-oligonucleotidilo y un cebador oligonucleótido,
- en la que en los casos en los que n es 0, Z³ es un radical 3'-O-oligonucleotidilo o un cebador oligonucleótido y en la que en los casos en los que n es 1, Z³ es O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, o C(Y);
- Z² se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺ y C(Y)R⁵;
- 45 Z⁵ y Z⁸ son cada uno OH;
- Z⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺, C(Y)R⁵ y fosfato;
- Z¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en O, S y Se;
- M⁺ es un catión;
- 50 X¹ es H;
- X², X³, X⁴ y X⁵ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en R¹, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, NO, NO₂, NCO, NCS, OCN, SCN y SSR³;
- R se selecciona del grupo que consiste en:



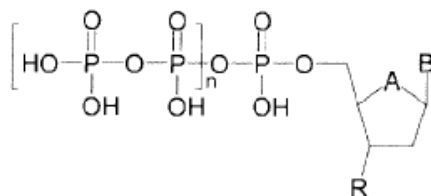
- R puede estar unido opcionalmente de manera covalente a X², X³, X⁴, X⁵, Z⁰, Z², Z⁹, A, W, o a la porción B de la molécula de NTP representada en la Fórmula IA;
- 5 cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un resto de ácido inorgánico, o derivado del mismo, con la excepción de ácido carbónico, en el que los derivados pueden incluir pero no se limitan a ellos halógeno, sulfonato, tio-sulfonato, seleno-sulfato, seleno-sulfonato, éster sulfato, tioéster sulfato, sulfito, sulfinato, éster sulfínico, nitrato, nitrito, ácidos que contienen fósforo, selenio y boro;
- 10 R⁷ se selecciona del grupo que consiste en un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono, en el que el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo y ariloxi;
- 15 cada R⁸, cada R⁹ y cada R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono, en el que el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo y ariloxi;
- 20 cada X⁶, cada X⁷, cada X⁸ y cada X⁹ se selecciona independientemente de cualquier grupo sustituido o sin sustituir que consiste en acilo, aciloxi, alquenilo, alqueniloarilo, alquenileno, alquilo, alquilo inferior, alquileo, alquinilo, alquinilarilo, alcoxi, alcoxi inferior, alquilarilo, alquilcarbonilamino, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, alquiltio, alquinileno, amido, amidino, amino, arilalquinilo, aralquilo, aroilo, arilalquilo, arilo, arilcarbonilamino, arileno, ariloxi, arilsulfonilamino, carbamato, ditiocarbamato, cicloalquenilo, cicloalquilo, cicloalquileo, guanidinilo, halo, halógeno, heteroarilo, heteroarilcarbonilamino, heteroariloxi, heteroarilsulfonilamino, heterociclo, hidrocarbilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbiloalquileo, hidrocarbilarboniloxi, hidrocarbilenilo, organosulfinilo, hidroxilo, organosulfinilo, organosulfonilo, sulfinilo, sulfonilo, sulfonilamino y sulfurilo;
- 25 cada X¹⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, NR¹¹, N-OR¹¹ y CR¹¹R¹²; cada R¹¹ y cada R¹² se selecciona independientemente de cualquier grupo sustituido o sin sustituir que consiste en acilo, aciloxi, alquenilo, alquenilarilo, alquenileno, alquilo, alquilo inferior, alquileo, alquinilo, alquinilarilo, alcoxi, alcoxi inferior, alquilarilo, alquilcarbonilamino, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, alquiltio, alquinileno, amido, amidino, amino, arilalquinilo, aralquilo, aroilo, arilalquilo, arilo, arilcarbonilamino, arileno, ariloxi, arilsulfonilamino, carbamato, ditiocarbamato, cicloalquenilo, cicloalquilo, cicloalquileo, guanidinilo, halo, halógeno, heteroarilo, heteroarilcarbonilamino, heteroariloxi, heteroarilsulfonilamino, heterociclo, hidrocarbilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbiloalquileo, hidrocarbilarboniloxi, hidrocarbilenilo, organosulfinilo, hidroxilo, organosulfinilo, organosulfonilo, sulfinilo, sulfonilo, sulfonilamino y sulfurilo; y
- 30 cada Y¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, NR⁶, N-OR⁶ y CR⁶R⁷.
- 35 En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, B es timina, citosina, adenina, guanina, uracilo, aminoalil-uracilo, 7-deazaguanina, 7-deaza-7-metilguanina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-aminoalil-guanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deazadenina, 2,6-diaminopurina, 5-nitro-citosina, 5-aminoalil-citosina, 5-(Biotin-16)-citosina, 5-(Fluorescein-11)-citosina, 4-metilamino-citosina, 2-tio-5-metiluracilo, o 4-tio-5-metiluracilo.

En modos de realización preferentes de la Fórmula IA, B es adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo.

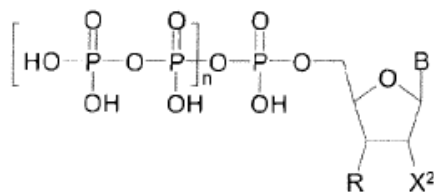
En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, X¹, X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z⁵ y Z⁸ son OH, son como se muestra a continuación:



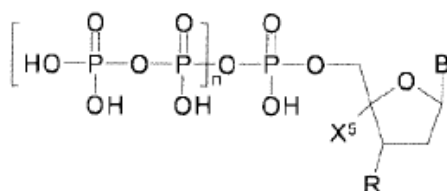
5 En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, A es NH, O, CH₂, o S; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



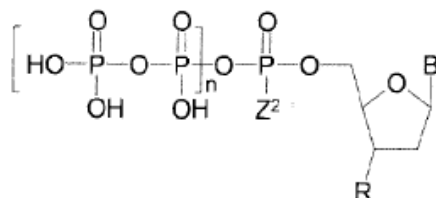
En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, X² es H, OH, F, CH₃, OCH₃, N₃, NH₂ o NHCH₃; A es O; X¹, X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



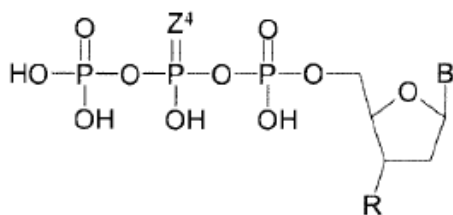
10 En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, X⁵ es H, SH, CH₃, F, O CH₃, NH₂, o NHCH₃; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



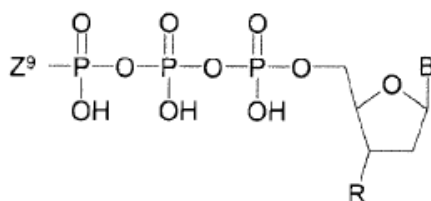
En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, Z² es OH, SH, BH₃, CH₃, OCH₃, o OCH₂ CH₃; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



15 En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, Z⁴ es O o S; n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.

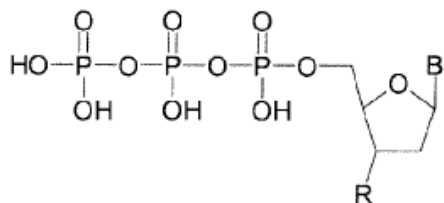


En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, Z⁹ es SH, S CH₂CH₂CN, OH, F, OCH₃, OCH₂CH₃, OC₆H₅, NHCH₃, NH₂, NHCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂ o grupos fosfato; n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵ y Z⁸ son OH, tal como se muestra a continuación.



5

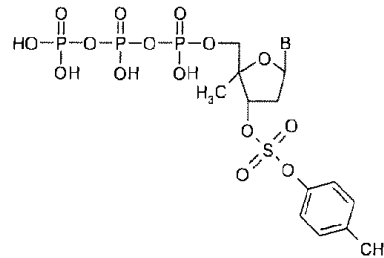
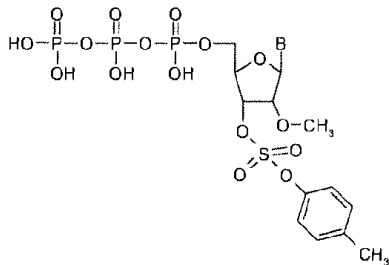
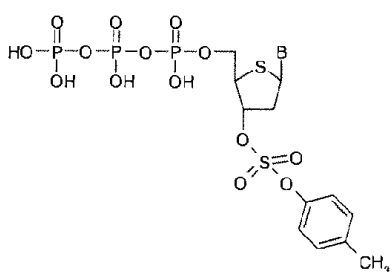
En ciertos modos de realización de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.

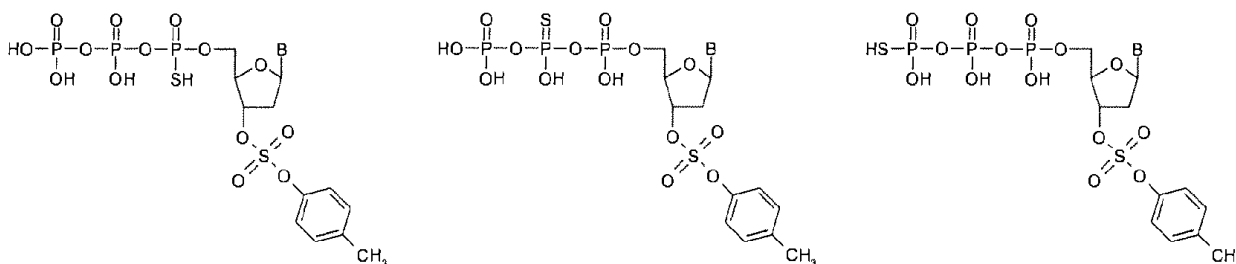


10

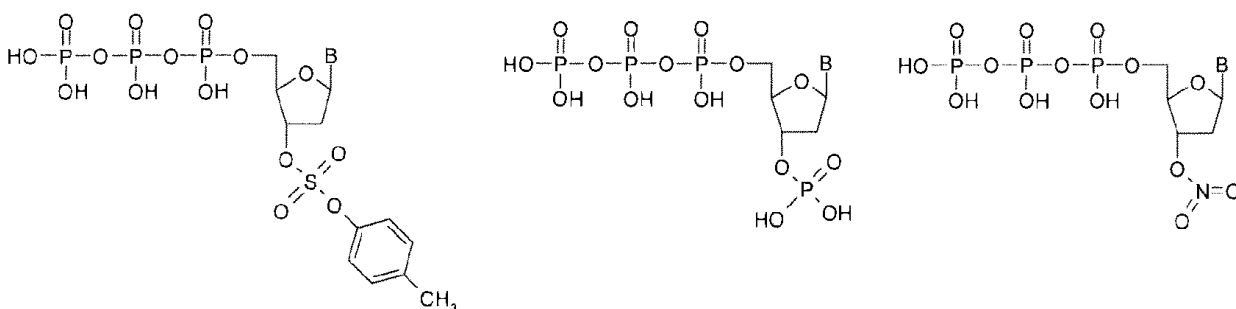
Ciertos modos de realización preferentes de la Fórmula IA son los siguientes (de arriba abajo, de izquierda a derecha). En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es S; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X³, X⁴ y X⁵ son H; X² es O-CH₃; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; X⁵ = CH₃; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z² es SH; Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; Z⁴ es S; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵ y Z⁸ son OH; Z⁹ es SH; y R es O-(p-toluen)sulfonato.

20

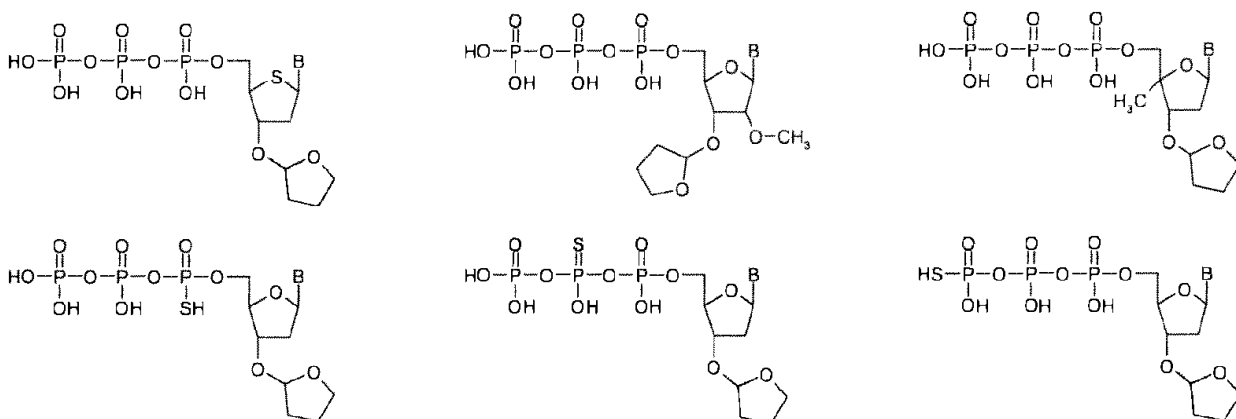




5 A continuación, se muestran modos de realización incluso más preferentes de la Fórmula. En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-(p-toluen)sulfonato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-fosfato. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-nitrato.

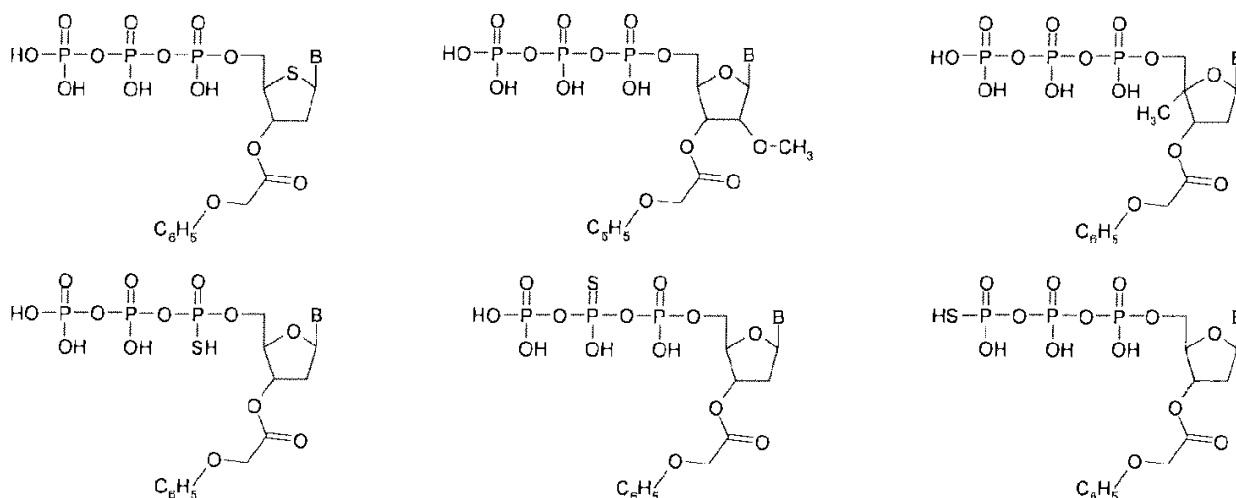


10 A continuación, se muestran ciertos modos de realización preferentes de la Fórmula IA (izquierda a derecha, arriba a abajo). En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es S; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidrofuranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X³, X⁴ y X⁵ son H; X² es O-CH₃; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidrofuranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; X⁵ = CH₃; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidrofuranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z² es SH; Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidrofuranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; Z⁴ es S; y R es O-tetrahidrofuranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵ y Z⁸ son OH; Z⁹ es SH; y R es O-tetrahidrofuranilo.

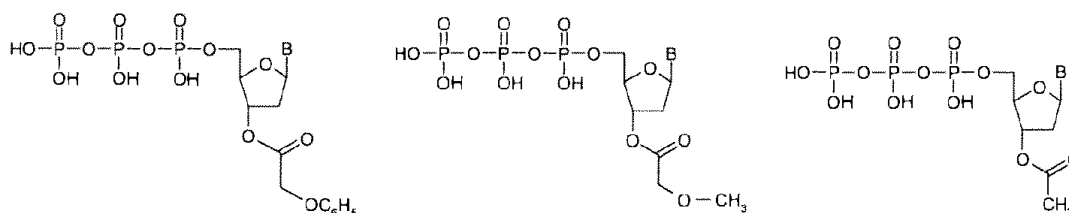


25 A continuación, se muestran ciertos modos de realización preferentes de la Fórmula IA (izquierda a derecha, arriba a abajo). En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-[4-metoxi]-tetrahidropirranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidropirranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-tetrahidropirranilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-[4-metoxi]-tetrahidropirranilo. En otro modo

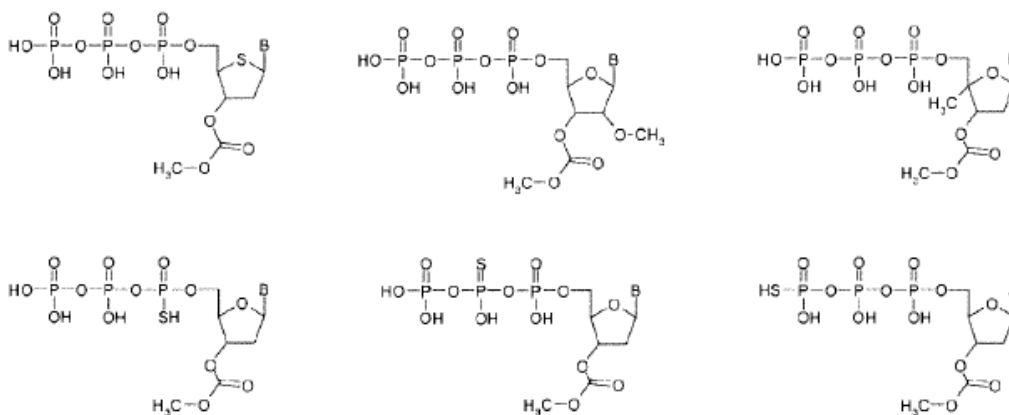
30



5 A continuación, se muestran modos de realización incluso más preferibles de la Fórmula IA. En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-fenoxiacetilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-metoxiacetilo. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-acetilo.

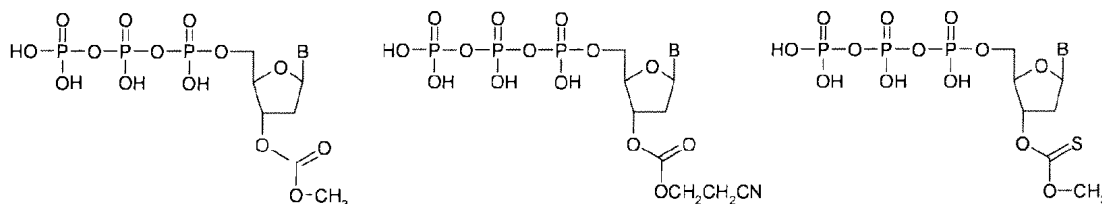


10 A continuación, se muestran modos de realización preferentes de la Fórmula IA (de arriba a abajo, de izquierda a derecha). En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es S; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-OCH₃. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X³, X⁴ y X⁵ son H; X² es O-CH₃; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-OCH₃. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z² es SH; Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-OCH₃. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-OCH₃. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵ y Z⁸ son OH; Z⁹ es SH; y R es O-C(O)-OCH₃.



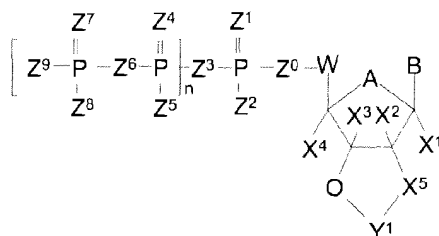
25 A continuación, se muestran modos de realización incluso más preferentes de la Fórmula IA. En un modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-OCH₃. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IA, n es 1;

A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(O)-CH₂CH₂CN. En otro modo de realización preferente de la Fórmula 1A, n es 1; A es O; X¹, X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; y R es O-C(S)-O CH₃.



- 5 En ciertos modos de realización de la Fórmula 1A, n es 0 de manera que Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷, Z⁸, Z⁹, P² y P³ no están presentes; y Z³ es un resto 3'-O-oligonucleotídico o un cebador oligonucleotídico, proporcionando en virtud de ello un "cebador terminado".

En un aspecto, los NTP 3'-sustituídos y los derivados del mismo, de acuerdo con la invención proporcionan compuestos de Fórmula 1B:



- 10 en la que:

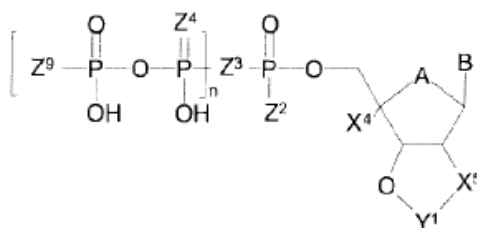
- n es 0 o 1;
 B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza de las mismas, o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP, preferentemente reconocible por ácido nucleico polimerasa;
 A se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
 W se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
 cada R¹ y cada R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, NR³R⁴, C(Y)R⁵ y alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,
 en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;
 cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
 cada R³ y cada R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y aralquilo sustituido o sin sustituir, en el que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;
 cada R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR³, SR³, NR³R⁴, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y aralquilo sustituido o sin sustituir,
 en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;
 Z¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;
 Z⁴ y Z⁷ son cada uno O;
 Z⁰ y Z⁶ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹ y C(Y);
 Z³ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, C(Y), un resto 3'-O-oligonucleotídico y un cebador oligonucleotídico,
 en la que, en los casos en los que n es 0, Z³ es un resto 3'-O-oligonucleotídico o un cebador oligonucleotídico y en la que, en los casos en los que n es 1, Z³ es O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, o C(Y);
 Z² se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺ y C(Y)R⁵;
 Z⁵ y Z⁸ son cada uno OH;
 Z⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺, C(Y) y fosfato;
 M⁺ es un catión;
 X¹ es H;
 X², X³ y X⁴ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en R¹, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, C(Y)R⁵, NO₂, CN y SSR³;
 X⁵ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, N R⁶, N-O R⁶ y C R⁶ R⁷;

- 5 Y¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, NR⁶, N-OR⁶, CR⁶R⁷ y C(Y); cada R⁶ y cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono, preferentemente 1-10 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono, en el que el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo; y X⁵ e Y¹ pueden estar opcionalmente unidos de manera covalente a X², X³, X⁴, X⁵, Z⁰, Z², Z⁹, A, W, o a la porción B de la molécula NTP representada en la Fórmula IB.

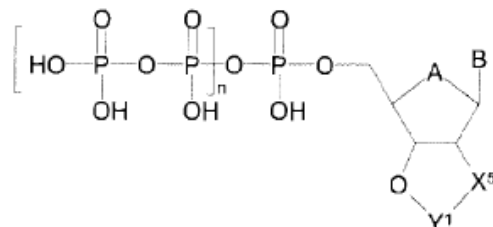
- 10 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, B es timina, citosina, adenina, guanina, uracilo, aminoalil-uracilo, 7-deazaguanina, 7-deaza-7-metilguanina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-aminoalil-guanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deazadenina, 2,6-diaminopurina, 5-nitro-citosina, 5-aminoalil-citosina, 5-(Biotin-16)-citosina, 5-(Fluorescein-11)-citosina, 4-metilamino-citosina y 2-tio-5-metiluracilo.

En modos preferentes de la Fórmula IB, B es adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo.

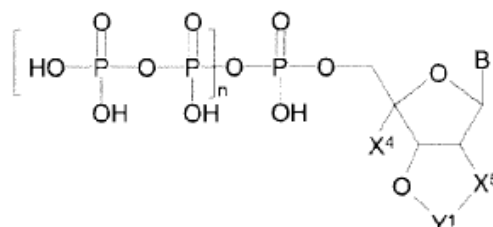
- 15 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, A es NH, O, CH₂ o S; X¹, X² y X³ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z⁶ y Z⁷ son O; Z⁵ y Z⁸ son OH, tal como se muestra a continuación.



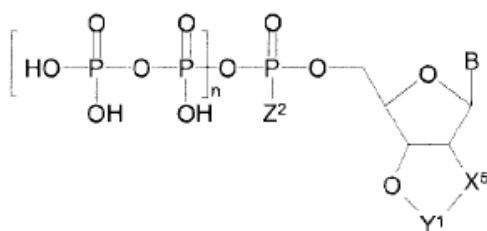
En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, A es NH, O, CH₂ o S; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



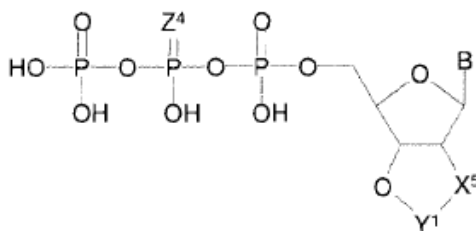
- 20 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, X⁴ es H, SH, CH₃, F, O CH₃, NH₂, o NHCH₃; A es O; X¹, X² y X³ son H; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



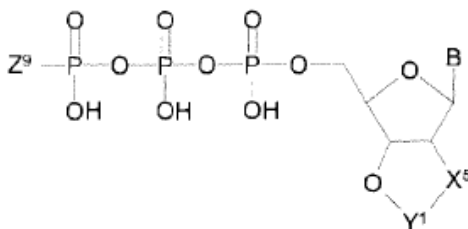
- 25 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, Z² es OH, SH, BH₃, CH₃, OCH₃, o OCH₂CH₃; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



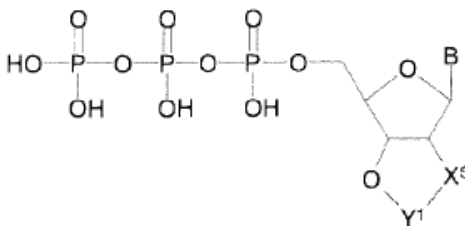
En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, Z⁴ es O o S; n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



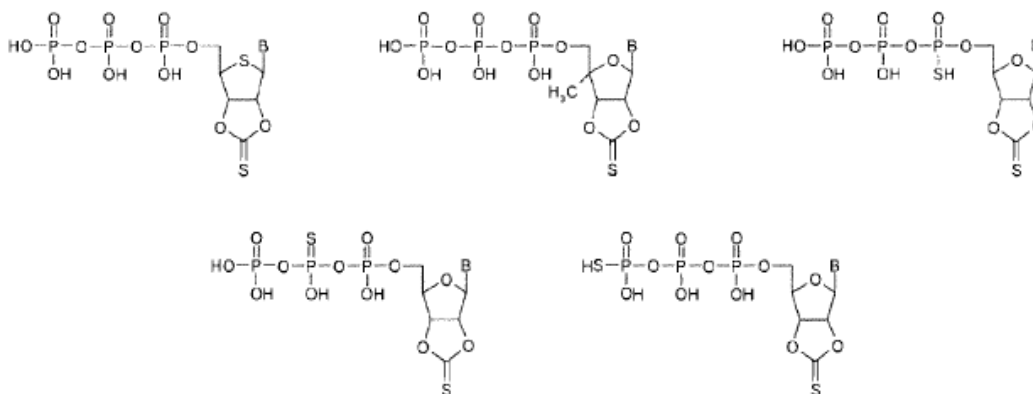
- 5 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, Z⁹ es SH, SCH₂CH₂CN, OH, F, OCH₃, OCH₂CH₃, NHCH₃, NH₂, NHCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂ NH₂, o un grupo fosfato; n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵ y Z⁸ son OH, tal como se muestra a continuación.



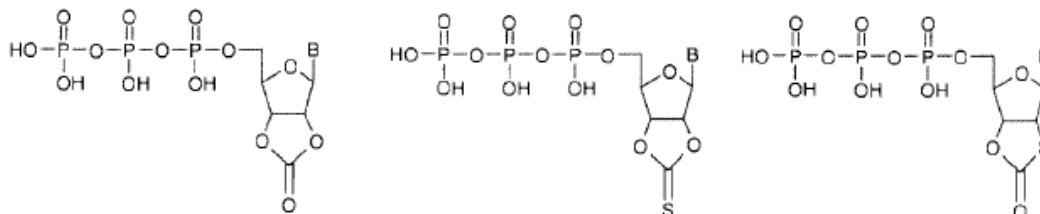
- 10 En ciertos modos de realización de la Fórmula IB, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; y Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH, tal como se muestra a continuación.



- A continuación, se muestran ciertos modos de realización preferentes de la Fórmula IB (izquierda a derecha, arriba a abajo). En un modo preferente de la Fórmula IB, n es 1; A es S; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es C-H₂; X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=S. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; A es O; X¹, X² y X³ son H; X⁴ es CH₃; W es CH₂; X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=S. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z² es SH; Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=S. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; Z⁴ es SH; e Y¹ es C=S. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; A es O; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵ y Z⁸ son OH; Z⁹ es SH; e Y¹ es C=S.



5 A continuación, se muestran modos de realización incluso más preferentes de la Fórmula IB. En un modo preferente de la Fórmula IB, n es 1; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; A, X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=O. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; X¹, X², X³ y X⁴ son H; W es CH₂; A, X⁵, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=S. En otro modo de realización preferente de la Fórmula IB, n es 1; X¹, X², X³ y X⁴ son H; X⁵ es S; W es CH₂; A, Z⁰, Z¹, Z³, Z⁴, Z⁶ y Z⁷ son O; Z², Z⁵, Z⁸ y Z⁹ son OH; e Y¹ es C=O.



10 En un modo de realización de la Fórmula IB, n es 0 de manera que Z⁴, Z⁵, Z⁶, Z⁷, Z⁸, Z⁹, P² y P³ no están presentes; y Z³ es un resto 3'-O-oligonucleotidilo o un cebador oligonucleotídico, en virtud de lo cual se proporciona un "cebador terminado."

15 En un aspecto, los procedimientos y composiciones del presente documento proporcionan NTP 3'-sustituídos para replicación de ácido nucleico. En algunos modos de realización, el NTP 3'-sustituído puede no tener ningún otro grupo de modificación en ninguna posición. En otros modos de realización el NTP 3'-sustituído contiene modificaciones adicionales, como por ejemplo modificaciones en la base, cadena de trifosfato, azúcar o combinaciones de las mismas. El NTP 3'-sustituído puede representarse mediante una fórmula química, Fórmulas IA-IB que se describen en el presente documento. En modos de realización preferentes, el NTP 3'-sustituído es un dTTP, dCTP, dATP, dGTP, o dUTP3'-sustituído.

20 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan procedimientos de síntesis de NTP 3'-sustituídos que tienen una estructura química como la representada en las Fórmulas IA-IB descritas en el presente documento. Los grupos de modificación, incluyendo los grupos de sustitución en 3', se pueden integrar en un NTP empleando procedimientos sintéticos o enzimáticos existentes. El NTP 3'-sustituído de los procedimientos y composiciones que proporciona el presente documento se pueden sintetizar a través de cualquiera de los procedimientos conocidos dentro de la técnica. Está publicada una visión de conjunto completa de una serie de procedimientos de síntesis de NTP modificados y sin modificar (Burgess, K. and Cook, D. 100 Chem. Rev., 2047-2059 (2000); "Nucleoside
25 Triphosphates and Their Analogs: Chemistry, Biotechnology and Biological Applications, Vaghefi, M. ed., Taylor and Francis, Boca Ratón (2005). Tras la síntesis y purificación de un NTP 3'-sustituído, se pueden emplear varios procedimientos diferentes para determinar la aceptabilidad del NTP en lo que se refiere a la estructura y la pureza. Entre los ejemplos de dichos procedimientos se incluyen Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masa, Espectroscopia Fluorescente, Espectroscopia Ultravioleta, Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento. Estos procedimientos son muy conocidos entre las personas especializadas en la técnica. Para los NTP 3'-sustituídos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento, también son aplicables los procedimientos que se emplean actualmente para separar, purificar y analizar en la técnica.

35 Se puede utilizar cualquier grupo de sustitución en 3' que satisfaga los propósitos de los procedimientos y composiciones que proporciona el presente documento. El grupo de sustitución en 3' deberá ser un grupo que disocie, se pueda eliminar o se convierta si no en un grupo hidroxilo abierto en las condiciones de una reacción de replicación en la que se vaya a emplear el NTP 3'-sustituído. Por otra parte, el grupo de sustitución en 3' no se deberá disociar o convertirse en un grupo 3'-OH abierto demasiado rápidamente a temperatura ambiente. La pérdida del grupo de sustitución en 3' deberá ser controlable por el usuario para conseguir los beneficios de los procedimientos y composiciones que proporciona el presente documento. El tipo y grado de sustitución en la
40

posición 3' del NTP se determina por lo general de forma empírica con la meta de conseguir los parámetros mencionados para controlar la disociación del grupo de sustitución en 3' del NTP o el cebador terminado. En algunos modos de realización, la conversión desde un grupo de sustitución en 3' en un grupo 3'-OH abierto es parcial (p.ej., en los casos en los que el grupo de sustitución en 3' se disocia desde una fracción de moléculas modificadas (p.ej., 3'-sustituidas)), por ejemplo, al menos 10 %; o al menos 20 %; o al menos 30 %; o al menos 40 %; o al menos 50 %; o al menos 60 %; o al menos 70 %; o al menos 80 %; o al menos 90 %; o al menos 95 %; o al menos 98 %; o al menos 99% de los NTP modificados (p.ej., NTP con un grupo de sustitución en 3') se convierte en NTP sin modificar (p.ej., NTP con un 3'-OH). En algunos modos de realización, la conversión de un grupo de sustitución en 3' tiene lugar a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0-105 °C; o aproximadamente 0-100 °C; o aproximadamente 20-100 °C; o aproximadamente 37-100 °C; o aproximadamente 50-100 °C; o aproximadamente 70-100 °C; o aproximadamente 45 °C; o aproximadamente 50 °C; o aproximadamente 55 °C; o aproximadamente 60 °C; o aproximadamente 65 °C; o aproximadamente 70 °C; o aproximadamente 75 °C; o aproximadamente 80 °C; o aproximadamente 90 °C; o aproximadamente 95 °C; o aproximadamente 96 °C; o aproximadamente 97 °C; o aproximadamente 98 °C; o aproximadamente 99 °C; o aproximadamente 100 °C. En algunos modos de realización, se utilizan dos tipos de NTP 3'-sustituidos diferentes y se pueden convertir los dos tipos de NTP 3'-sustituidos diferentes a aproximadamente la misma temperatura o temperaturas diferentes. En un modo de realización preferente, se convierte un primer NTP 3'-sustituido a una temperatura de desnaturalización inicial para la reacción de PCR (~95 °C) y un segundo NTP 3'-sustituido se convierte a la temperatura de desnaturalización inicial para reacción de transcriptasa inversa (~50 °C). La posibilidad para seleccionar los grupos de sustitución en 3' sobre la base de sus propiedades de conversión permite al usuario combinar los reactivos para reacciones de replicación diferentes en el mismo recipiente de reacción (p.ej. el usuario solo necesitaría preparar una sola pre-mezcla para dos reacciones diferentes, en lugar de la práctica habitual de preparar una pre-mezcla para cada reacción. Por consiguiente, se pueden realizar diversas combinaciones de reacciones de replicación en un solo recipiente de reacción utilizando NTP 3'-sustituidos selectivos para cada reacción de replicación diferente.

En otro modo de realización, los NTP 3'-sustituidos de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento pueden contener átomos quirales en el grupo de sustitución en 3' o en cualquier otra parte de la molécula de NTP incluyendo el grupo o grupos de modificación. La quiralidad puede llevar a diastereómeros individuales de NTP 3'-sustituidos o una mezcla de los diastereómeros. El NTP 3'-sustituido puede ser una mezcla racémica o diastereomérica o un compuesto quiralmente puro al 70 %, o 80 %, o 90 %, o 95 %, o 99 %, o 100 %.

En algunas reacciones de replicación, no todas las moléculas de NTP en la reacción de replicación contendrán un grupo de sustitución en 3'. Preferentemente, incluso una mezcla de NTP en estado inactivo/de terminación o 3'-sustituidos y NTP activo 3'-sin sustituir mejora la eficacia y la especificidad de la replicación de una población mixta, en comparación con los casos en que no se utilizan NTP 3'-sustituidos en absoluto. Preferentemente, antes de la incubación a una temperatura de desnaturalización inicial, los NTP 3'-sustituidos componen al menos 25 % del total de moléculas de NTP, preferentemente al menos 50% del total de moléculas de NTP, preferentemente al menos 75 % del total de moléculas de NTP y preferentemente al menos 90 % del total de moléculas de NTP, preferentemente al menos 95 % del total de moléculas de NTP, preferentemente al menos 98 % del total de moléculas de NTP, más preferentemente al menos 99 % del total de moléculas de NTP y más preferentemente 100 % del total de moléculas de NTP. En otro modo de realización, pueden estar sustituidos en 3' dos, tres, cuatro o todos los tipos de NTP.

En un modo de realización, solamente un tipo de NTP en la reacción de replicación está sustituido en 3', mientras que todos los demás tipos de NTP son moléculas de NTP regulares. Por ejemplo, en los casos en los que dATP, dTTP, dGTP y dCTP son los tipos de NTP en una reacción de replicación, solamente los dATP están sustituidos en 3' y los dTTP, dGTP y dCTP son moléculas de NTP regulares. En otro modo de realización, dos o más tipos de NTP están sustituidos en 3'. En otro modo de realización, tres o más tipos de NTP están sustituidos en 3'. En otro modo de realización, dos o más tipos de NTP están sustituidos en 3'.

En otro modo de realización, más de un tipo de NTP 3'-sustituidos pueden estar presentes en la reacción de replicación. Se puede utilizar una mezcla de NTP 3'-sustituidos en una reacción de replicación. En un modo de realización, puede estar presente una mezcla de NTP no sustrato y NTP de terminación en la misma reacción de replicación. En otro modo de realización, puede estar presente una mezcla de NTP 3'-sustituidos con diferentes grupos de sustitución en la misma reacción de replicación.

En otro aspecto, los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento proporcionan un nucleósido químicamente modificado con un grupo de sustitución en 3' que es eliminable, o convertible en un grupo 3'-hidroxilo abierto con calor. Dicho nucleósido modificado puede convertirse en el NTP correspondiente a través de procedimientos que son compatibles con los procedimientos de síntesis actuales. Se puede preparar el NTP 3'-sustituido correspondiente de cualquier nucleósido. En cambio, la modificación con glioxilo (Bonner y col., Solicitud de patente estadounidense No. 20030162199), que también representa un grupo termolábil (pero no es un grupo de sustitución en 3') tan solo se puede añadir a la base heterocíclica de NTP que contiene guanina. Por lo tanto, la modificación glioxilo termolábil está restringida a un tipo de NTP, mientras que en los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento, cualquiera o todos los NTP pueden tener un grupo de sustitución en 3' termolábil.

En otro aspecto más, en el presente documento se proporciona un procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos dependiente de matriz utilizando NTP 3'-sustituídos, tal como se describe en el presente documento.

Se pueden utilizar conjuntamente con los procedimientos y las composiciones proporcionados en el presente documento ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), que es una polimerasa termoestable, así como otras ADN o ARN polimerasas incluyendo ADN polimerasas dependientes de ADN, ADN polimerasas dependientes de ARN, ARN polimerasas dependientes de ADN y ARN polimerasas dependientes de ARN. En algunos modos de realización, una reacción de replicación incluye un ácido nucleico polimerasa y una o más enzimas entre las que se incluyen una segunda ácido nucleico polimerasa, ligasas (p.ej., ADN ligasas, ARN ligasas), sintetasas, nucleasas (p.ej., enzimas de restricción de ácido nucleico, endonucleasas guiadas, endonucleasas melladas), proteínas de reparación de ADN, metiltransferasas, quinasas, fosfatasa, sulfurilasas, recombinasas, transcriptasas inversas, helicasas y otras enzimas conocidas en la técnica.

Un aspecto de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento proporciona un NTP no sustrato 3'-sustituído con un grupo de sustitución en 3' eliminable por calor a temperaturas que son compatibles con los procedimientos de replicación en uso actualmente o con los que se puedan desarrollar en el futuro. La presencia de un grupo de sustitución en 3' puede dañar la incorporación del NTP 3'-sustituído mediante ácido nucleico polimerasa, o puede interrumpir el reconocimiento del NTP 3'-sustituído mediante ácido nucleico polimerasa o puede prevenir de otra forma la extensión del cebador mediada por polimerasa (Figura 1A). El cebador oligonucleótido no se extenderá mediante ácido nucleico polimerasa hasta que la reacción de replicación alcance una temperatura hot-start óptima para convertir el grupo de sustitución en 3' del NTP en un grupo 3'-OH y transforme el NTP al estado activo. La conversión del NTP 3'-sustituído a su estado activo coincide preferentemente con la etapa de desnaturalización inicial de la PCR. La activación "hot start" de la reacción de replicación de ácido nucleico disminuye significativamente la formación de productos de replicación o deseados al prevenir la extensión de cebador a bajas temperaturas.

Otro aspecto de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento proporciona un NTP de terminación 3'-sustituído con un grupo de sustitución en 3' eliminable o convertible en un grupo hidroxilo abierto con calor a temperaturas compatibles con los procedimientos de replicación que se están utilizando actualmente y con los que se puedan desarrollar en el futuro. El NTP de terminación 3'-sustituído se incorpora en el extremo 3' del cebador mediante ácido nucleico polimerasa para generar un cebador terminado. El cebador terminado está en un estado de terminación y no es extendible mediante ácido nucleico polimerasa, en virtud de lo cual se impide la formación de productos de replicación no deseados. Cuando la reacción de replicación alcanza una temperatura hot start rigurosa alta óptima, se elimina el grupo de sustitución en 3' o se convierte en un grupo 3'-OH abierto, dando como resultado la conversión del cebador terminado en un cebador extendible que es compatible con la replicación de ácido nucleico y que se puede seguir alargando (Figura 8).

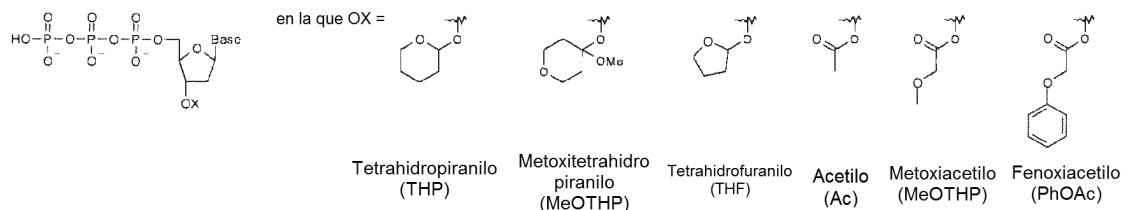
Además de ser estable a temperatura ambiente en solución de tampón, el NTP 3'-sustituído, tal como se desvela en el presente documento es preferentemente estable en las condiciones para la síntesis, separación y purificación de NTP tales como cromatografía, precipitación, almacenamiento a largo plazo y preparación de mezclas de reacción de replicación.

A continuación, se describirán con mayor detalle los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento haciendo referencia a los siguientes ejemplos no exhaustivos.

Ejemplo 1

Preparación de 2'-desoxirribonucleósidos 3'-sustituídos

Se seleccionaron seis grupos de sustitución en 3' de dTTP: tetrahidropiranilo (THP), 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), tetrahydrofuranilo (THF), acetilo (Ac), metoxiacetilo (CH₃OAc) y fenoxiacetilo (PhOAc).



Se sintetizaron los derivados 3'-éter de timidina de acuerdo con la siguiente fórmula de síntesis general. En primer lugar, se hizo reaccionar timidina con 1,2 equivalentes de anhídrido acético en piridina. Se separó en compuestos individuales la mezcla resultante de timidinas 3'-O-acetilo, 5'-O-acetilo y 3',5'-O-bis-acetilo sustituidas por cromatografía en gel de sílice. Se hizo reaccionar la 5'-O-acetilimidina aislada con 2,3-dihydrofuran, 3,4-dihidro-2H-pirano o 5,6-dihidro-4-metoxi-2H-pirano en presencia de ácido p-toluensulfónico en dioxano durante 5 horas. El tratamiento posterior con amoníaco metanólico para eliminar el grupo de protección 5'-O-acetilo produjo los

derivados 3'-THF, 3'-THP o 3'-MTHP de timidina respectivamente. Se prepararon los desoxirribonucleósidos dA y dC 3'-THF sustituidos partiendo de N-benzoil-2'-desoxiadenosina y N-benzoil-2'-desoxicitidina aplicando un enfoque similar al de la síntesis de 3'-THF-dT, en el que la protección necesaria de la posición 5'- se consiguió a través de la reacción de los nucleósidos mencionados con cloruro de benzoilo en piridina. Se sintetizó 3'-THF-2'-desoxiguanosina partiendo de 5'-levulinilo N-isobutilil-2'-desoxiguanosina disponible en el mercado, aplicando la misma ruta de síntesis general que se ha esbozado para la síntesis 3'-THF-dT.

Se prepararon 3'-O-metoxiacetilo y éster 3'-O-fenoxiacetilo de timidina de acuerdo con otra ruta de síntesis general, tal como sigue. Se trató la 5'-DMT-timidina con cloruro de metoxiacetilo o anhídrido fenoxiacético en piridina, seguido de la eliminación con ácido del grupo DMT para formar el correspondiente derivado 3'-éster de timidina. Se aisló la 3'-O-acetiltimidina por cromatografía en gel de sílice tal como se ha especificado anteriormente.

En líneas generales, se aislaron 2'-desoxinucleósidos 3'-sustituidos en rendimientos globales de 12-60 %.

Ejemplo 2

5'-trifosforilación de 2'-desoxirribonucleósidos 3'-sustituidos

Se prepararon 2'-desoxinucleósido 5'-trifosfatos 3'-sustituidos a partir de 2'-desoxinucleósidos 3'-éter y 3'-éster sustituidos de acuerdo con el procedimiento de Ludwig-Eckstein (J. Org.Chem., 54, 631-635 (1989)) del siguiente modo.

Se hizo reaccionar 2'-desoxinucleósido 3'-sustituido con 1,1 equiv. de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona en solución de dioxano-piridina seguido de reacción con 1,6 equiv. de pirofosfato de tributilamonio, posterior oxidación con yodo de P(III) a P(V) y un tratamiento final con bicarbonato de trietilamonio acuoso. Se aislaron los dNTP 3'-sustituidos y se purificaron a través de una combinación de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía en fase inversa para obtener dNTP 3'-sustituido 98-99 % puro como sal sódica o potásica. Se confirmaron las estructuras de los compuestos sintetizados por espectrometría de masa, RMN de fósforo y protones.

Ejemplo 3

Cinética de la conversión de dTTP que contiene un grupo 3'-sustituido en el dTTP natural correspondiente

Se investigó la conversión del dTTP 3'-sustituido en el dTTP sin modificar correspondiente en tampón de PCR (pH 8,4 a 25 °C, Tabla 1) a 20°C y 95°C. Se llevó un seguimiento de las reacciones mediante el análisis de las mezclas incubadas por HPLC de intercambio aniónico y fase inversa. En la Fig. 3 se presenta la formación resultante del dTTP en función del tiempo a 95 °C. En la Tabla 1 se presenta la concentración estimada de dTP que se formó a partir de dTTP 3'-sustituido al cabo de 2, 10 y 20 minutos de incubación a 95 °C.

A temperatura ambiente (en torno a los 20 °C) en tampón de PCR, todos los dTTP 3'-éster sustituidos fueron estables durante el menos varios días. Entre los derivados dTTP 3'-éster, los derivados de dTTP 3'-O[CH₃OAc] y 3'-O[PhOAc] presentaron una segmentación de 4 % y 10 % del grupo 3'-éster, respectivamente, en 60 minutos de incubación en el tampón de PCR a temperatura ambiente, en cambio, para el derivado de dTTP 3'-O-[Ac] solo se detectó un 6 % de segmentación del grupo 3'- acetilo al cabo de 24 horas de incubación.

Tabla 1: Concentración estimada de formación de dTTP sin modificar en solución 250 mM de dTTP 3'-sustituido durante incubación a 95 °C en tampón PCR (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 8,4 a 25 °C)).

grupo sustitución en 3'	Concentración de dTTP sin modificar, µM		
	2 min	10 min	20 min
-O(Ac)	0	5	18
-O(THP)	≤1	10	16
-O(MTHP)	2	21	47
-O(THF)	7	39	57
-O(CH ₃ OAc)	35	140	195
-O(PhOAc)	50	170	209

Ejemplo 4

Incorporación de dTTP 3'-sustituidos mediante ADN polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq) y Klenow en experimentos de extensión de cebador

Se evaluó la capacidad de la ADN polimerasa Klenow (exo-) para realizar extensiones de cebador a temperatura ambiente de un bicatenario cebador/matriz emparejado en 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl₂, 1

mM DTT, 0,5 unidades de enzima, 0,2 mM dATP y en presencia de uno de los siguientes derivados de dTTP 3'-sustituídos: dTTP 3'-THP, dTTP 3'-MTHP o dTTP 3'-THF (Figura 4 (arriba)). En los experimentos de incorporación y extensión, se observó que ninguno de los derivados de dTTP 3'-sustituídos (dTTP 3'-THP, dTTP 3'-MTHP y dTTP 3'-THF) se habían incorporado en el cebador (en correspondencia con el control negativo "sin dTTP"). Esta conclusión de que los derivados de dTTP 3'-sustituídos no fueron sustratos para ADN polimerasa Klenow (exo-) se corresponden con el mecanismo propuesto de la Fig. 1A. Como control adicional, los autores de la invención observaron que tras una etapa de precalentamiento de 40 minutos a 95 °C, todos los análogos de dTTP 3'-sustituídos anteriores pasaron a ser sustratos para la enzima y se comportaron de manera similar para dTTP sin modificar (Figura 4 (abajo)). Esto confirma que una etapa de precalentamiento convierte dTTP 3'-sustituído en dTTP adecuado para reacciones de incorporación y extensión.

Se llevaron a cabo experimentos de incorporación/extensión a lo largo del tiempo con dTTP 3'-O-acetilo y se demostró que dTTP 3'-O-acetilo no es sustrato para ADN polimerasa Klenow (exo-) de acuerdo con los datos publicados (Metzker y col., 22 Nucleic Acids Res., 4259-4267 (1994)). Los derivados de dTTP 3'-O-metoxiacetilo y 3'-O-fenoxiacetilo no se sometieron a ensayo ya que los experimentos cinéticos (Ejemplo 3) demostraron que estos grupos de sustitución en 3' no serían estables durante la reacción de extensión.

Se repitieron los experimentos de extensión con ADN polimerasa *Taq* a temperatura ambiente utilizando 25 unidades de enzima y o bien dTTP 3'-THF o bien dTTP 3'-Ac. Los resultados fueron similares a los obtenidos utilizando ADN polimerasa Klenow (exo-) ya que ambos derivados dTTP 3'-sustituídos no fueron sustrato para ADN polimerasa *Taq*.

Se evaluó también el comportamiento de dCTP 3'-THF en experimentos de extensión de cebador. Los resultados generados para este análogo fueron similares a los dTTP 3'-THF, lo que indica que los derivados dATP y dGTP 3'-sustituídos no son sustitutos adecuados para ADN polimerasa Klenow (exo-) o *Taq*.

Ejemplo 5

Formación de productos de amplificación no específicos en ausencia de matriz de ADN durante PCR en presencia de dTTP 3'-sustituídos

Para explorar el efecto de NTP 3'-sustituídos en el rendimiento de PCR, se llevaron a cabo experimentos utilizando condiciones de PCR que favorecen la formación de productos de amplificación no específicos, en ausencia de matriz. Se emplearon cebadores oligonucleótidos dirigidos o bien al fragmento de 356 pb de gen *tat* VIH-1 o bien al fragmento 1,9 kb de Lambda ADN (Tabla 2). Se sabe que ambos sistemas rinden altos niveles de productos de amplificación no específicos, incluyendo dímeros de cebador, durante la PCR. Se llevaron a cabo reacciones de amplificación en ausencia de una matriz. Cada mezcla de PCR (50 µl) contenía cebadores de VIH tanto directos como inversos (0,5 µM cada uno), dATP, dCTP y dGTP (200 µM cada uno), *Taq* polimerasa (0,5 unidades), 1x tampón PCR (véase pie de página de la Tabla 1) y ADN del Genoma Humano (50 ng). Se añadieron diferentes derivados en 3' de dTTP a 200 µM de concentración final a cada reacción, los parámetros de ciclo de la PCR incluyeron una etapa inicial de 95°C durante 2 min; seguido de 40 ciclos de [95 °C durante 40 seg; 56 °C durante 30 seg; 72 °C durante 2 min]; seguido de 72 °C durante 7 min. Se detectaron los productos de amplificación no específicos, incluyendo dímeros de cebador, por electroforesis en gel de agarosa como fragmentos de ~50 pares de bases en el sistema ADN VIH y fragmentos de ~500 pares de bases en el sistema Lambda ADN (Figuras 5 (calles 5 y 6) y 6 (calles 6-9)).

Se investigaron los derivados dTTP 3'-sustituídos (acetilo, fenoxiacetilo, tetrahidropiraniolo, metoxitetrahidropiraniolo y tetrahidrofuranilo) en el sistema de amplificación descrito anteriormente. En líneas generales, el análisis de los datos de la electroforesis en gel de agarosa (Figuras 5 y 6) reveló que, en ausencia de matriz, el nivel de productos de amplificación no específicos en la PCR disminuyó varias veces en los casos en los que se utilizaron dTTP 3'-sustituídos en lugar de dTTP natural. Los dTTP 3'-sustituídos disminuyeron la acumulación de productos de amplificación no específicos, incluyendo dímeros de cebador.

Tabla 2. Sistemas de PCR cebador/matriz investigados

Sistema	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Longitud amplicón
VIH-1	GAATTGGGTGTCAACATAGCAGAAT	AATACTATGGTCCACACAACACTATTGCT	365 pb
Lambda ADN	AAGGAGCTGGCTGACATTTTCG	CGGGATATCGACATTTCTGCACC	1,9 kb

Ejemplo 6**Formación de productos de amplificación no específicos en presencia de matriz de ADN durante PCR en presencia de dNTP 3'-sustituidos**

5 Para los sistemas Lambda ADN y VIH-1 ADN (Tabla 2), se utilizaron condiciones de PCR en las que se formaron rápidamente productos de amplificación no específicos, incluyendo dímeros de cebador, en presencia de matriz. Estas condiciones emplearon una concentración 1 μ M de cebadores oligonucleótido tanto directos como inversos, 10 copias de matriz HIV-1 o 10.000 Lambda ADN, 0,2 mM de cada uno, dNTP o dNTP3'-sustituido y 2,0 mM $MgCl_2$. Cada mezcla contenía 50 ng de ADN del Genoma Humano. Los parámetros del ciclo térmico fueron los siguientes: 95 °C durante 2 min; 40 ciclos de [95 °C durante 40 seg; 56 °C durante 30 seg; 72 °C durante 2 min]; 72 °C durante 7 min. Se analizaron las reacciones por electroforesis en gel de agarosa (Figuras 5 y 6).

15 En todos los casos, la sustitución de dTTP natural por un derivado de dTTP 3'-sustituido mejoró el rendimiento de la PCR en comparación con una reacción de PCR de control, en la que se utilizaron los cuatro dNTP naturales (compárese las calles 4 y 1-3 en la Figura 5 y calles 1 y 3-5 en la Figura 6). En ambos sistemas de matriz, Lambda y VIH-1, los análisis presentaron no solamente un descenso de la cantidad de productos de amplificación no específicos, incluyendo dímeros de cebador, sino también presentó el correspondiente aumento de formación de amplicón. Con los derivados de dTTP 3'-THF y 3'-PhOAc- una mejora 3-8 veces mayor tuvo como resultado en la relación de amplicón con respecto a los productos no específicos, incluyendo dímeros de cebador (figuras 5 y 6) en comparación con dTTP, mientras que con los derivados de dTTP 3'-THP y 3'-Ac, el rendimiento global de la PCR no fue tan bueno como el de dTTP natural (no se muestra).

20 Se examinaron todas las permutaciones de la sustitución de uno, dos, tres o cuatro dNTP 3'-THF (del grupo dATP 3'-THF, 3'-dGTP, dCTP 3'-THF- y dTTP 3'-THF) para sus equivalentes naturales y el efecto resultante en la reducción de la formación de dímero de cebador. En general, se observó que cualquiera de las sustituciones de dNTP natural por cada uno de los dNTP 3'-THF mejoró el rendimiento de la PCR. Según esto, se observó para el derivado dATP 3'-THF, tanto una fuerte reducción de los productos de amplificación no específicos como un aumento de la formación de amplicón específica (Figura 7). Una sustitución combinada de dNTP natural por dos o más derivados de dNTP 3'-THF mejoró aún más el rendimiento de PCR. Por lo tanto, la combinación de dTTP 3'-THF y dATP 3'-THF, para reemplazar dTTP y dATP, eliminó casi completamente los productos de amplificación no específicos en el sistema VIH-1 (una mejora aproximadamente 10 veces mayor, Figura 7). En líneas general, existió una fuerte correlación entre el uso de más de un tipo de dNTP 3'-sustituidos en una mezcla de PCR y la eficiencia y especificidad de la producción de amplicón.

Ejemplo 7**PCR en tiempo real "Hot Start" con dNTP 3'-sustituidos**

35 Se examinó el rendimiento de dNTP 3'-THF en amplificación por PCR en tiempo real en sistema modelo VIH-1 en presencia de ADN de Genoma Humano como experimento prototípico para detección de patógeno. En particular, se comparó el rendimiento de un grupo sustituido por partida triple con dNTP (dATP 3'-THF, dCTP 3'-THF y dTTP 3'-THF y dGTP sin modificar) con un grupo que contenía los cuatro dNTP sin modificar. Al examinar los gráficos de amplificación sigmoidales que reflejan la acumulación de amplicón, se observó que la forma de la curva para el grupo de datos dNTP 3'-THF era mucho más pronunciada para dNTP natural sin modificar. La forma de la curva es una indicación (Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF. 339 Neurosci Lett. 62-6 (2003)) de que la eficiencia de la amplificación por PCR es mejor en presencia de dNTP 3'-THF en comparación con dNTP naturales. Por otra parte, se observó que existió una clara correlación entre el número de copias de plantilla de entrada y el valor Ct (indicación que es posible generar datos fiables utilizando dNTP 3'-sustituidos en experimentos en tiempo real).

Ejemplo 8**Enfoque de activación "Hot Start" aplicado a ensayos de detección PNS**

45 La identificación de polimorfismos genéticos que guardan una correlación con la susceptibilidad de patología y/o eficacia de un fármaco ayudará al desarrollo de diagnósticos y tratamientos terapéuticos. Se han desarrollado enfoques para descubrir y genotificar polimorfismo de nucleótido simple (PNS) (véase, por ejemplo, Cozza, A. y col., BMC Genomics, 2007. 8: p. 10; Kwok, P.Y., Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. 2: p. 235-58). Algunos de los enfoques comercializados para descubrir PNS incluyen plataformas con capacidad de multiplexación, tales como Third Wave Invader-Cleavase (Allawi, H.T. y col., J Clin Microbiol, 2006. 44(9), p. 3443-7); Matriz de perlas en suspensión de Luminex (Dunbar, S.A., Clin Chim Acta, 2006. 363(1-2), p. 71-82); Pirosecuenciado de Biotage (Langae, T. y col., Mutat Res, 2005. 573(1-2), p. 96-102); TaqMan de Applied Biosystems y genotipificación de PNSlex (De la Vega, F.M. y col., Mutat Res, 2005. 573(1-2), p. 111-35); y PCR específica de alelo de Roche Cobas y procedimientos de extensión de base simple dirigidos a matriz (Chen, X. y col., Genome Res, 1999. 9(5), p. 492-8). Existen diversas plataformas de alta capacidad que incluyen el ensayo de genotipificación GoldenGate de Illumina BeadArray (Shen, R. y col., Mutat Res, 2005. 573(1-2), p. 70-82); Ensayo de Sonda de Inversión Molecular de ParAllele en matrices Affymetrix GeneChip (Matsuzakil, H. y col., Genome Res, 2004. 14(3), p. 414-25); y

genotipificación en matrices de alta densidad de Perlegen (Easton, D.F., y col., Nature, 2007. 447(7148), p. 1087-93), que tienen la capacidad, cada uno de ellos, de determinar el genotipo de múltiples sitios de PNS simultáneamente.

5 Uno de los mayores retos de la detección de PNS es la dificultad de desarrollar un medio robusto para diferenciar entre una secuencia de tipo silvestre y la correspondiente secuencia que contiene una mutación puntual. Muchos enfoques satisfactorios implican el uso de múltiples enzimas en una serie de reacciones secuenciales, en las que cada etapa sucesiva mejora aún más la especificidad de la detección. Uno de los inconvenientes más notables de los protocolos de detección de PNS multi-enzima actuales es la necesidad de tubos de ensayo abiertos en las etapas intermedias del ensayo para transferir los productos de reacción y/o para añadir los reactivos y los componentes de reacción necesarios para las etapas enzimáticas en dirección 3'. La reducción o eliminación de las etapas de intervención del usuario intermedias a) mejorará la eficiencia del ensayo, b) reducirá el tiempo y el coste y c) reducirá la probabilidad de errores técnicos durante la manipulación de la muestra.

15 En la Fig. 8 se presenta un esquema de ensayo de formato de tubo cerrado mejorado para la detección de PNS. El formato de PCR GEXL combina la utilidad de NTP 3'-sustituidos y cebadores modificados con fosfotriéster termolábiles (Zon, G. y col., Solicitud de patente estadounidense. No. 20070281308) con una reacción de rellenado del gap (ADN polimerasa), una unión de muesca (ADN Ligasa) y amplificación por PCR Hot Start. Este enfoque representa una versión modificada de ensayos de PNS desarrollados por distintas empresas (ParAllele, Illumina, Applied Biosystems). La característica clave que permite un formato de un tubo es la posibilidad de incluir todos los componentes para una reacción de amplificación por PCR en dirección 3' (enzimas, dNTP y cebadores) sin que interfieran en las etapas de rellenado del gap y ligamiento a baja temperatura. En particular, todos los dNTP excepto aquellos en los que se necesita rellenar un gap están sustituidos con dNTP 3'-THF. Asimismo, el cebador de fosfotriéster biotinilado que se une a la región zipcode (secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia 3'-terminal del cebador fosfotriéster) de la sonda donadora (el oligonucleótido ligante que contiene grupo 5'-fosfato) se bloquea desde la extensión utilizando modificación de cebador con fosfotriéster termolábil. Al realizar el rellenado de gap/extensión (Etapa 2) y las etapas de sellado de muesca/ligamiento (Etapa 3) a temperaturas más bajas (0-20°C), disminuye en gran medida la probabilidad de episodios no deseados tales como la pérdida del grupo de sustitución en 3' de los dNTP 3'-sustituidos con posibilidad de incorporación en gap de dNTP incorrecto, con posterior ligamiento, o extensión incontrolable del cebador biotinilado. Tras la etapa de activación térmica (Etapa 4), el grupo 3'-THF de los dNTP 3'-sustituidos y el grupo de protección del fosfotriéster del cebador se eliminan permitiendo que se inicie y prosiga la amplificación por PCR. En líneas generales, el uso de componentes sustituidos (dNTP 3'-sustituidos y cebadores de fosfotriéster) permite un enfoque más simplificado para preparar un material para análisis de PNS eliminando la necesidad de una etapa de manipulación entre las Etapas 2 y 4.

35 A no ser que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden generalmente las personas especializadas en la técnica a la que pertenece la invención.

Las invenciones que se describen a modo ilustrativo en el presente documento se pueden poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no desvelados de forma específica en el presente documento. Según esto, por ejemplo, las expresiones "que comprende", "que incluye" o "que contiene", etc. deberán interpretarse de forma expansiva y sin limitación. Asimismo, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han utilizado como términos de descripción y sin limitación y no se pretende que en el uso de dichos términos y expresiones se excluya ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de los mismos, sino que se reconozcan que son posibles diversas modificaciones dentro del ámbito de la invención que se reivindica.

45 Según esto, debe entenderse que, si bien la presente invención ha sido desvelada específicamente con modos de realización preferentes y características opcionales, las personas especializadas en la técnica pueden recurrir a modificación, mejora y variación de la invención compendiada en el presente documento y que dichas modificaciones, mejoras y variaciones deben considerarse incluidas en el ámbito de la presente invención. Los materiales, procedimientos y ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de modos de realización preferentes, son ilustrativos y no se pretende que sean limitaciones del ámbito de la invención.

50 La invención ha sido descrita de forma amplia y genérica en el presente documento. Todas las especies más restringidas y agrupaciones subgenéricas que entren dentro de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una salvedad o limitación negativa que elimine cualquier materia dada del género, independientemente de que se cite o no específicamente en el presente documento el material sacado.

55 Asimismo, en los casos en los que se describan las características o aspectos de la invención en términos de grupos Markush, las personas especializadas en la técnica reconocerán que la invención también se describe conforme a ello en lo que se refiere a cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de replicación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho procedimiento:

la replicación de ácido nucleico en un medio de reacción de replicación, comprendiendo dicho medio de reacción de replicación al menos un NTP y un tampón de reacción,
 5 en el que dicho al menos un NTP añadido a dicho tampón de reacción comprende un grupo de sustitución en 3'-térmicamente lábil y
 en el que dicha replicación está precedida de inducción térmica por incubación de dicho medio de reacción de replicación a 50 °C-100 °C.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el NTP 3'-sustituido deteriora o impide la extensión del ácido nucleico mediante la polimerasa, en particular en el que al menos un NTP 3'-sustituido es un NTP no sustrato o un NTP de terminación.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el grupo de sustitución en 3'- se convierte en un grupo 3'-hidroxilo abierto durante la replicación de ácido nucleico, por ejemplo durante la etapa de inducción térmica inicial de la replicación de ácido nucleico.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho grupo de sustitución en 3' se convierte en un grupo 3'-hidroxilo abierto a una temperatura entre aproximadamente 70 °C-100 °C o aproximadamente 50 °C.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de reacción de replicación comprende NTP 3'-sustituidos con dos o más grupos de sustitución en 3' diferentes, opcionalmente, en el que los diferentes grupos de sustitución en 3' se convierten en grupos 3'-hidroxilo abiertos a diferentes temperaturas, tal como, un primer grupo de sustitución en 3' se convierte en un grupo 3'-hidroxilo abierto a aproximadamente 50 °C y un segundo grupo de sustitución en 3' se convierte a aproximadamente 95 °C.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la replicación de ácido nucleico es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje o ensamblaje de ciclos de polimerasa (PCA), PCR asimétrica, PCR de colonias, PCR en emulsión, PCR rápida, PCR de ligamiento de Extensión Gap (GEXL-PCR), Reacción en cadena de la ligasa Gap (Gap LCR), PCR Hot Start, PCR específica intersecuencial (ISSR) PCR, PCR inversa, PCR mediada por ligasa, PCR lineal después de exponencial (LATE-PCR), PCR específica de metilación (MSP), amplificación de sonda dependiente de ligandos múltiples (MLPA), PCR multiplex, PCR anidada, PCR de extensión solapada, PAN-AC, PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), PCR en tiempo real, transcripción inversa (RT), amplificación rápida de extremos ADNc (RACE PCR), amplificación de molécula simple (SMA PCR), PCR térmica de entrelazado asimétrico (TAIL-PCR), PCR Touchdown, PCR larga, amplificación isotérmica o PCR por transcripción inversa (RT-PCR).

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de replicación de ácido nucleico comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en ADN polimerasas dependientes de ADN, ADN polimerasas dependientes de ARN, ARN polimerasas dependientes de ADN, ARN polimerasas dependientes de ARN y restrictasas y/o en el que dicho ácido nucleico es ADN, ARN, LNA, PNA o una combinación de los mismos.

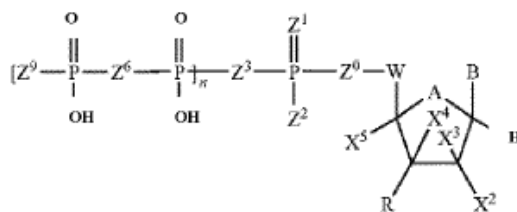
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos NTP son uno o más NTP 3'-sustituidos seleccionados del grupo que consiste en dATP 3'-sustituido, dTTP 3'-sustituido, dGTP 3'-sustituido, dCTP 3'-sustituido y dUTP 3'-sustituido.

9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que dichos NTP 3'-sustituidos comprenden dATP 3'-sustituido, dTTP 3'-sustituido, dGTP 3'-sustituido y dCTP 3'-sustituido o en el que dichos NTP 3'-sustituidos comprenden dATP 3'-sustituido, dUTP 3'-sustituido, dGTP 3'-sustituido y dCTP 3'-sustituido.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos NTP 3'-sustituidos comprenden además uno o más grupos de modificación adicionales y/o un marcador detectable.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo de sustitución en 3' se selecciona del grupo que consiste en O-[4-metoxi]tetrahidropiraniolo; O-tetrahidropiraniolo; O-tetrahidrofuranilo; O-fenoxiacetilo; O-metoxiacetilo; O-acetilo; O-(p-toluen)sulfonato; O-fosfato; O-nitrato; O-[4-metoxi]-tetrahidrotiopiraniolo; O-tetrahidrotiopiraniolo; O-[5-metil]-tetrahidrofuranilo; O-[2-metil,4-metoxi]-tetrahidropiraniolo; O-[5-metil]-tetrahidropiraniolo; y O-tetrahidrotiofuranilo.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el NTP 3'-sustituido y los derivados del mismo tiene la estructura de la Fórmula IA:



en la que:

n es 0 o 1;

5 B se selecciona entre purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza de la misma o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP;

A se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

W se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

10 cada R¹ y cada R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, C(Y)R⁵ y alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,

en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

15 cada R³ y cada R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir, en el que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

20 cada R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, C(Y)R³ y alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir,

en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

cada Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

Z¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

25 Z⁰ y Z⁶ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹ y C(Y);

Z³ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, C(Y), un resto 3'-O-oligonucleotidilo y un cebador oligonucleótido,

en la que en los casos en los que n es 0, Z³ es un resto 3'-O-oligonucleotidilo o un cebador oligonucleótido y

en la que en los casos en los que n es 1, Z³ es O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, o C(Y);

25 Z² se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺ y C(Y)R⁵;

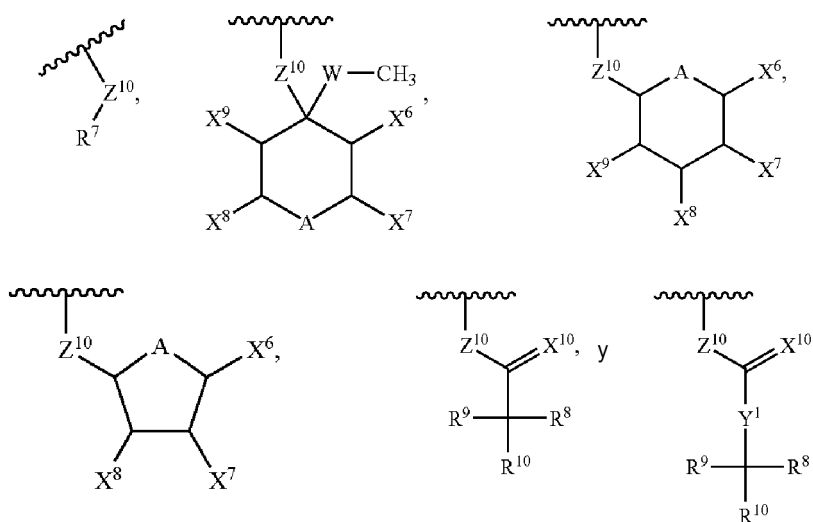
Z⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺, C(Y)R⁵ C(Y)R⁵ y fosfato;

Z¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en O, S y Se;

30 M⁺ es a catión;

X², X³, X⁴ y X⁵ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en R¹, NR³ OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, NO, NO₂, NCO, NCS, OCN, SCN y SSR³;

R se selecciona del grupo que consiste en



35 R puede estar opcionalmente unido de manera covalente a X², X³, X⁴, X⁵, Z⁰, Z², Z⁹, A, W, o a la porción B de la

molécula NTP representada en la Fórmula IA;

cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un resto de ácido inorgánico, o derivado del mismo, con la excepción de ácido carbónico, en el que los derivados pueden incluir pero no se limitan a ellos halógeno, sulfonato, tio-sulfonato, seleno-sulfato, seleno-sulfonato, éster sulfato, tioéster sulfato, sulfito, sulfinato, éster sulfínico, nitrato, nitrito, ácidos que contienen fósforo, selenio y boro;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono,

en el que el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo y arilo;

cada R⁸, cada R⁹ y cada R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono,

en el que el hidrocarbilo es alquilo, alqueno o alquino que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo y arilo;

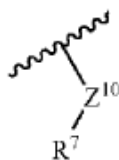
cada X⁶, cada X⁷, cada X⁸ y cada X⁹ se selecciona independientemente de cualquier grupo sustituido o sin sustituir que consiste en acilo, aciloxi, alqueno, alquenoarilo, alquenileno, alquilo, alquilenilo, alquino, alquinoarilo, alcoxi, alquilarilo, alquilcarbonilamino, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, alquiltio, alquilenilo, amido, amidino, amino, arilalquino, aralquilo, aroilo, arilalquilo, arilo, arilcarbonilamino, arileno, ariloxi, arilsulfonilamino, carbamato, ditiocarbamato, cicloalqueno, cicloalquilo, cicloalquilenilo, guanidinilo, halo, halógeno, heteroarilo, heteroarilcarbonilamino, heteroariloxi, heteroarilsulfonilamino, heterociclo, hidrocarbilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo, organosulfino, organosulfonilo, sulfinilo, sulfonilo, sulfonilamino y sulfurilo;

cada X¹⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, NR¹¹, N-OR¹¹ y CR¹¹R¹²;

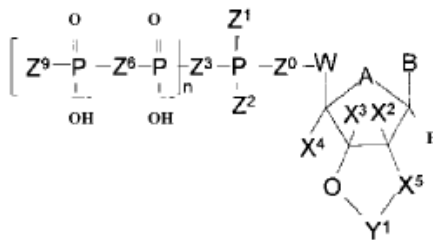
cada R¹¹ y cada R¹² se selecciona independientemente entre cualquier grupo sustituido o sin sustituir que consiste en acilo, aciloxi, alqueno, alquenoarilo, alquenileno, alquilo, alquilenilo, alquino, alquinoarilo, alcoxi, alquilarilo, alquilcarbonilamino, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, alquiltio, alquilenilo, amido, amidino, amino, arilalquino, aralquilo, aroilo, arilalquilo, arilo, arilcarbonilamino, arileno, ariloxi, arilsulfonilamino, carbamato, ditiocarbamato, cicloalqueno, cicloalquilo, cicloalquilenilo, guanidinilo, halo, halógeno, heteroarilo, heteroarilcarbonilamino, heteroariloxi, heteroarilsulfonilamino, heterociclo, hidrocarbilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo, hidrocarbilarbonilo, organosulfino, hidroxilo, organosulfino, organosulfonilo, sulfinilo, sulfonilo, sulfonilamino y sulfurilo; y

cada Y¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, NR⁶, N-OR⁶ y CR⁶R⁷.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que R es:



14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el NTP 3'-sustituido y los derivados del mismo tienen la estructura de fórmula Fórmula IB:



en la que:

n es 0 o 1;

B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza de las mismas, o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP;

A se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

W se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

cada R¹ y cada R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, NR³R⁴,

C(Y)R⁵ y alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo sustituido o sin sustituir, en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos; cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

5 cada R³ y cada R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y aralquilo sustituido o sin sustituir, en el que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

10 cada R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, OR³, SR³, NR³R⁴, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y aralquilo sustituido o sin sustituir, en la que cualquiera de los sustituyentes puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos;

Z¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, CR¹R² y NR¹;

Z⁰ y Z⁶ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹ y C(Y);

15 Z³ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, C(Y), un resto 3'-O-oligonucleotidilo y un cebador oligonucleótido, en la que, en los casos en los que n es 0, Z³ es un resto 3'-O-oligonucleotidilo o un cebador oligonucleótido en la que, en los casos en los que n es 1, Z³ es O, S, Se, O₂, CR¹R², NR¹, o C(Y);

20 Z² se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺ y C(Y)R⁵;

Z⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, (BH₃)-M⁺, C(Y) y fosfato;

M⁺ es un catión;

25 X², X³ y X⁴ se seleccionan cada uno de ellos independientemente del grupo que consiste en R¹, F, Cl, Br, I, OR³, SR³, SeR³, NR³R⁴, NR³OR³, NR³-NR³R⁴, CN, N₃, C(Y)R⁵, NO₂, CN y SSR³;

X⁵ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, NR⁶, N-OR⁶ y CR⁶R⁷;

Y¹ se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se, NR⁶, N-OR⁶, CR⁶R⁷ y C(Y);

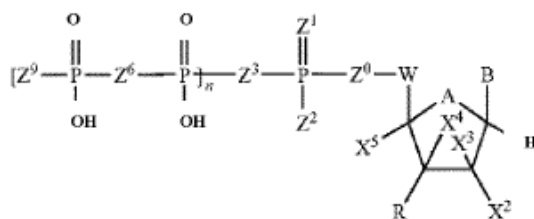
30 cada R⁶ y cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo hidrocarbilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1-20 átomos de carbono, en el que el hidrocarbilo es alquilo, alquenilo o alquinilo que puede incluir opcionalmente al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, oxo, hidroxilo, alcoxi, amino, amido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, ariloxi y heteroarilo;

y

35 X⁵ e Y¹ pueden estar opcionalmente unidos de manera covalente a X², X³, X⁴, X⁵, Z⁰, Z², Z⁹, A, W, o la porción B de la molécula NTP representada en la Fórmula IB.

15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, el que B es timina, citosina, adenina, guanina, uracilo, aminoaliluracilo, 7-deazaguanina, 7-deaza-7-metilguanina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-aminoalil-guanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deazadenina, 2,6-diaminopurina, 5-nitro-citosina, 5-aminoalil-citosina, 5-(Biotin-16)-citosina, 5-(Fluorescein-11)-citosina, 4-metilamino-citosina y 2-tio-5-metiluracilo, o 4-tio-5-metiluracilo.

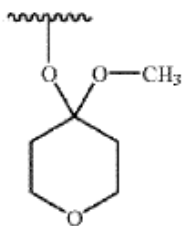
16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el NTP 3'-sustituido y derivados del mismo tiene la estructura de la Fórmula IA:



en la que:

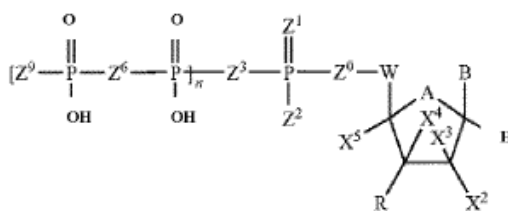
45 B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza de la misma o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP;

R es



X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³ y Z⁶ son O; Z² y Z⁹ son OH; A es O; y n=1.

17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el NTP 3'-sustituido y derivados del mismo tiene la Fórmula IA:

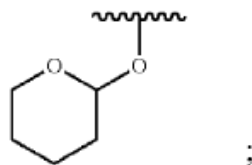


5

en la que:

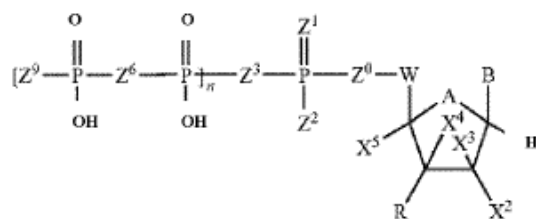
B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza del mismo o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP;
R es

10



X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³ y Z⁶ son O; Z² y Z⁹ son OH; A es O; y n=1.

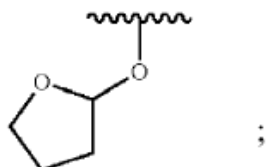
18. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el NTP 3'-sustituido y derivados del mismo tiene la estructura de Fórmula IA:



15

en la que:

B se selecciona entre una purina o pirimidina sustituida o sin sustituir, cualquier derivado aza o deaza de las mismas o cualquier "base universal" o "base degenerada" de cualquier análogo de NTP;
R es



20

X², X³, X⁴ y X⁵ son H; W es CH₂; Z⁰, Z¹, Z³ y Z⁶ son O; Z² y Z⁹ son OH; A es O; y n=1.

19. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el grupo de sustitución en 3' se selecciona del grupo que consiste en O-[4-metoxi]tetrahidropirano; O-tetrahidropirano; O-tetrahidrofuranilo.

Dos posibles mecanismos de PCR Hot Star con NTP 3'-sustituídos

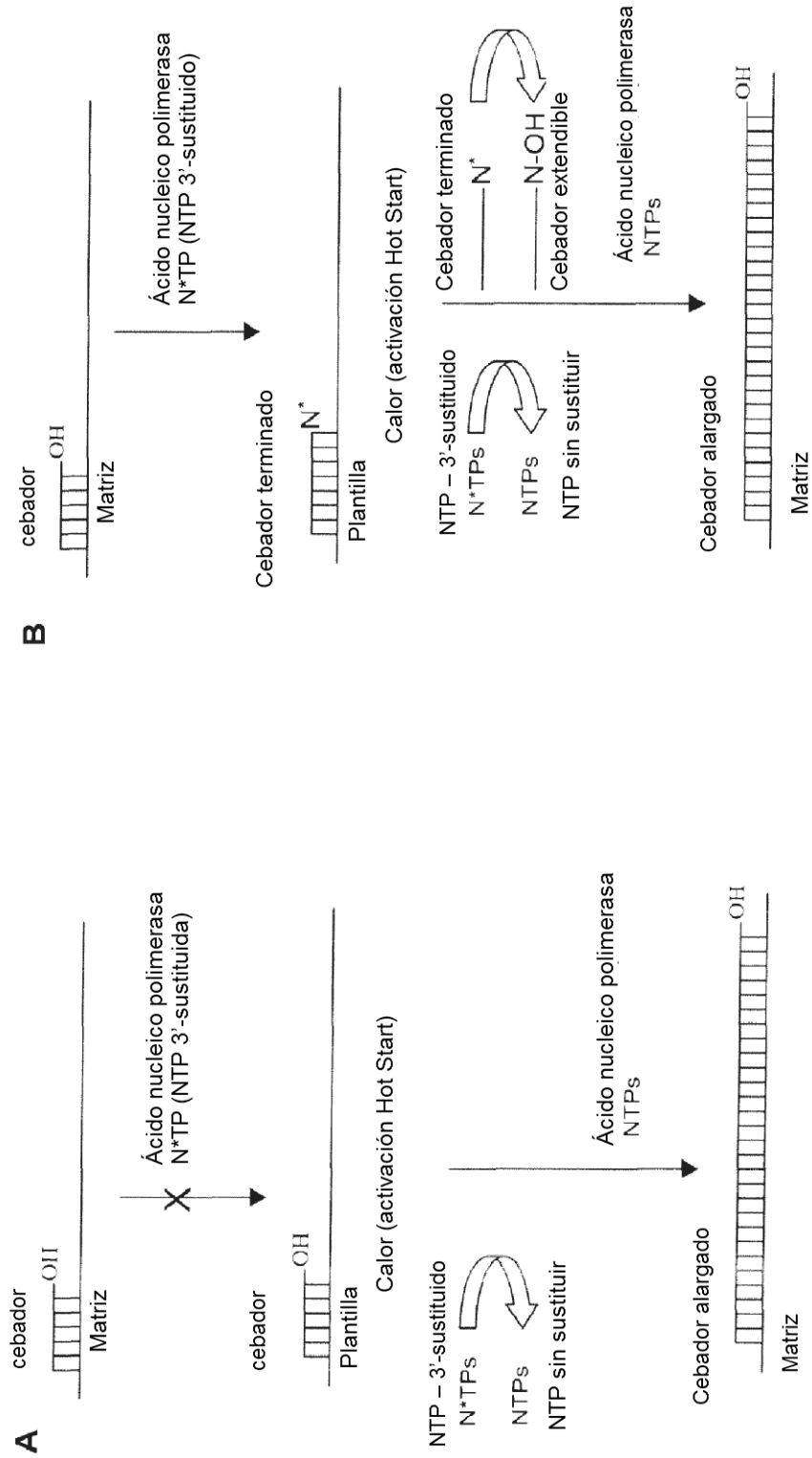
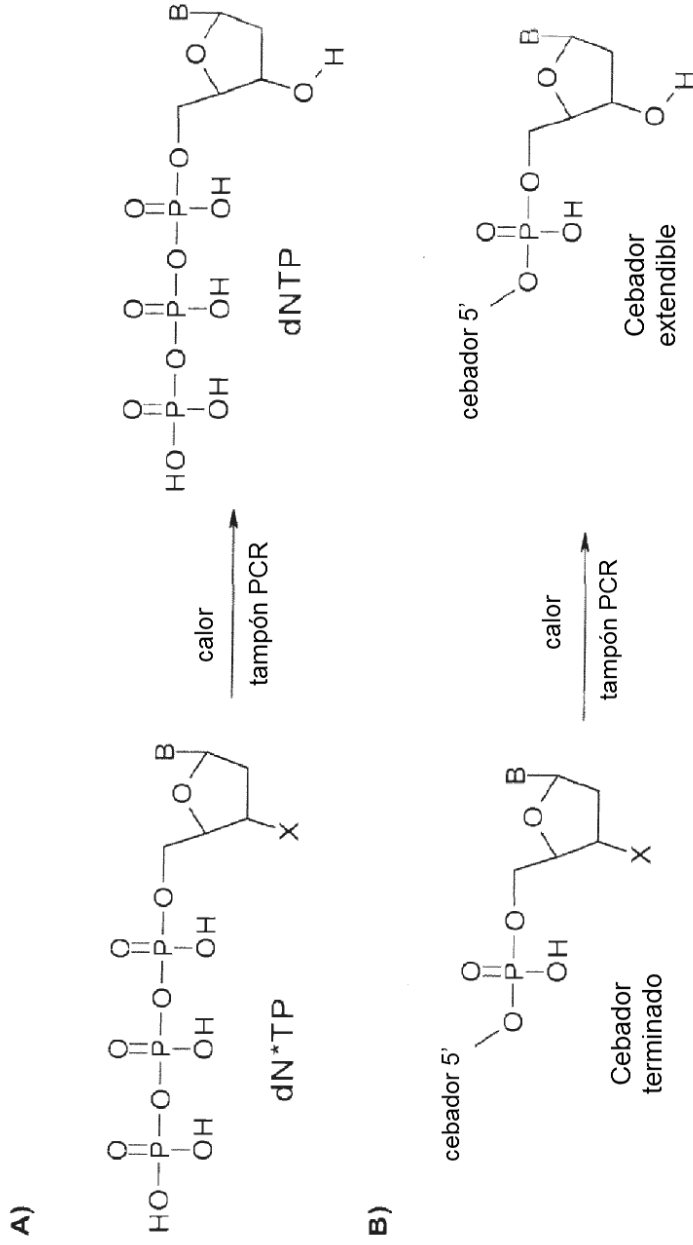


Figura 1

Activación Hot Start de NTP 3'-sustituido (A) o cebador terminado (B)



X = grupo de sustitución en 3' termolábil

Figura 2

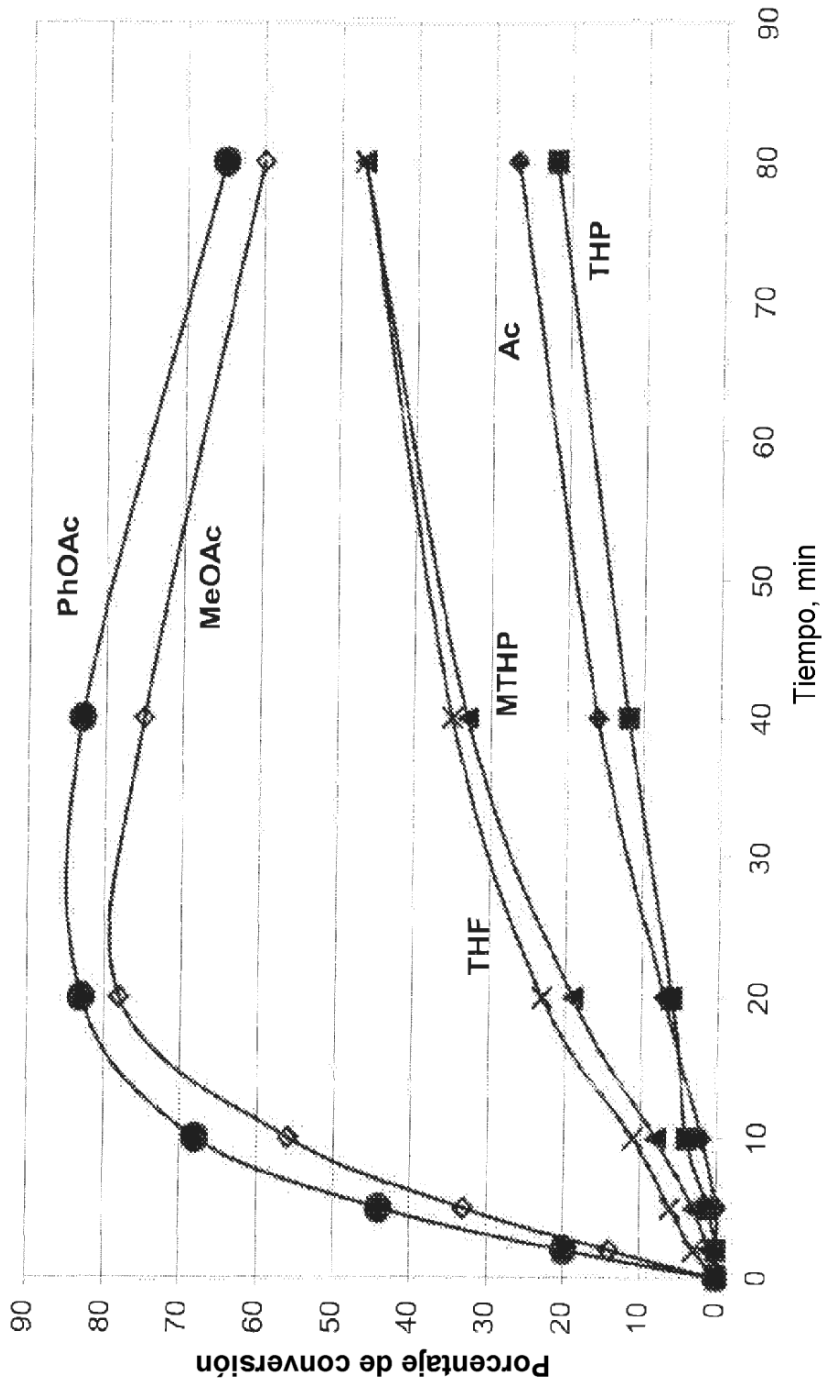


Figura 3

Experimentos de extensión de cebador con dTTP 3' - sustituidos y fragmento de Klenow de ADN polimerasa I

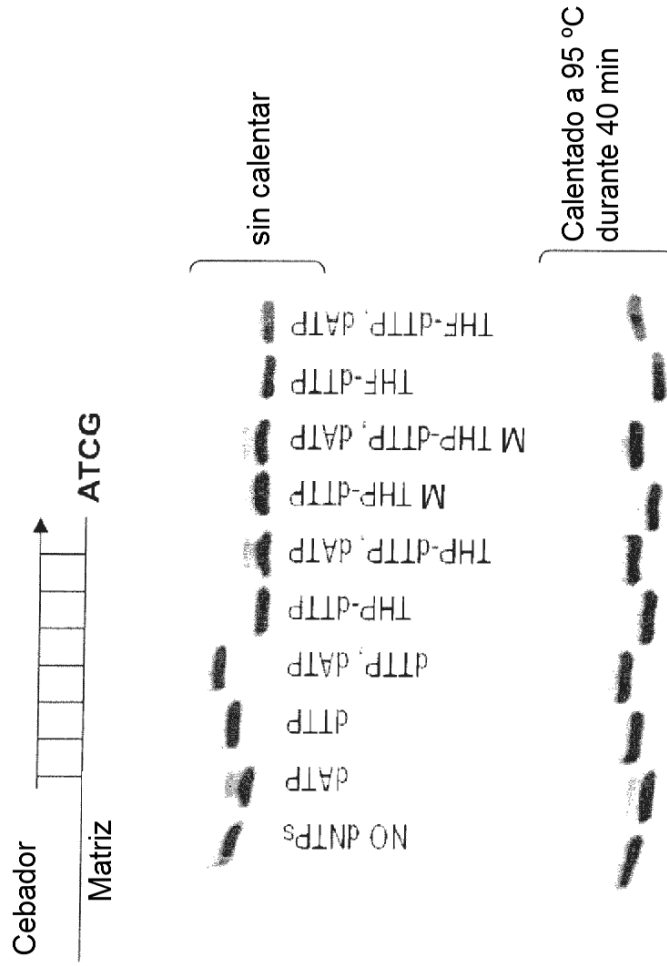
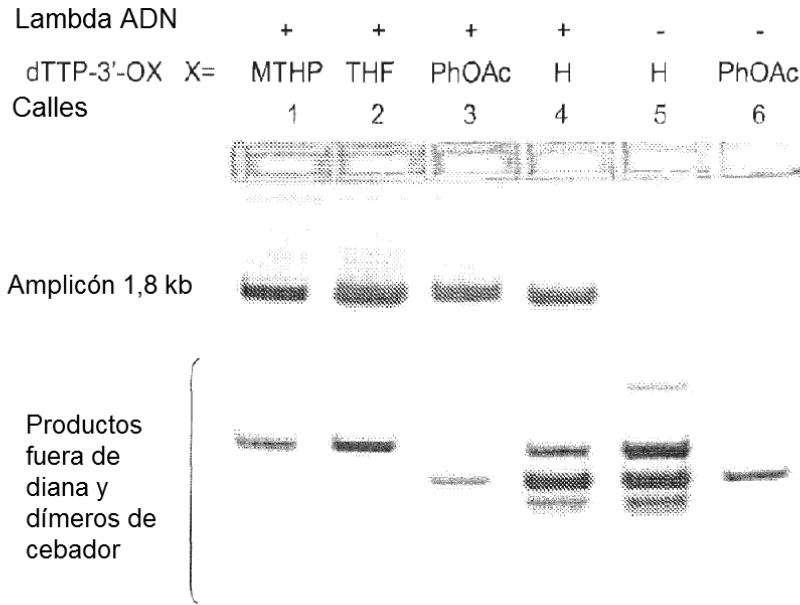


Figura 4

Análisis en gel de agarosa de mezclas PCR



Cada muestra de PCR contiene una mezcla de dTTP-3'-OX, dATP, dCTP y

Lambda ADN – Relación entre amplicón y productos fuera de diana

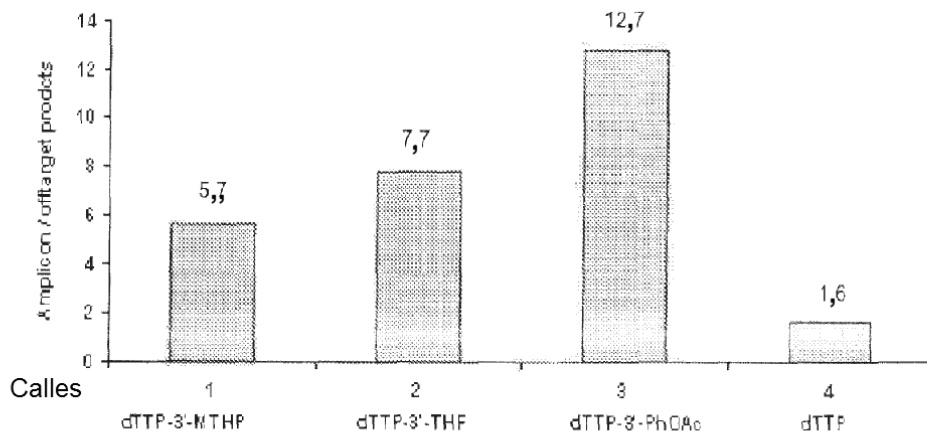
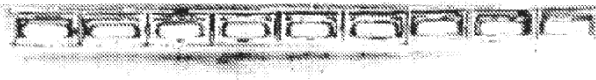


Figura 5

Análisis en gel de agarosa de mezclas PCR

VIH-1 ADN	+	+	+	+	+	-	-	-	-
dTTP-3'-OX X=	H	*	MTHP	THF	PhOAc	H	MTHP	THF	PhOAc
Calles	1	2	3	4	5	6	7	8	9



Amplicón, 365 pb

Productos fuera de diana y dímeros de cebador

Cada muestra de PCR contiene una mezcla de dTTP-3'-OX, dATP, dCTP y dGTP

* Mezcla PCR no contiene dTTP

VIH-1 ADN: relación entre amplicón y productos fuera de diana

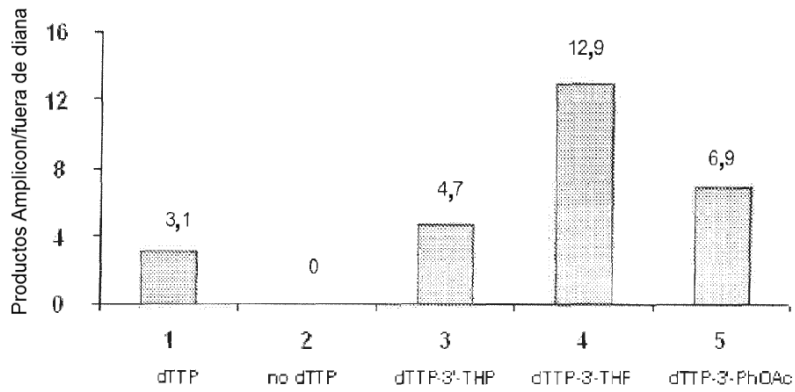
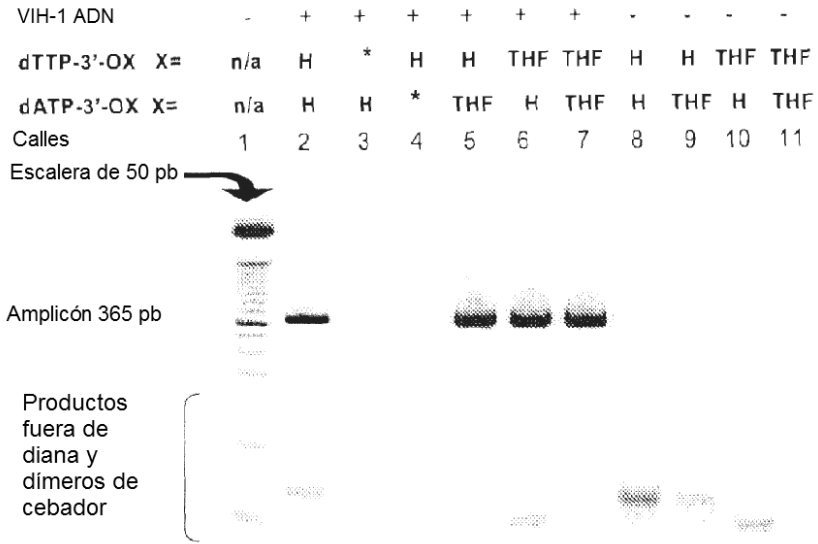


Figura 6

Análisis en gel de agarosa de mezclas PCR



Cada muestra de PCR contiene una mezcla de dTTP-3'-OX, dATP-3'-OX, dCTP y dGTP
 * Mezcla PCR no contiene dTTP

VIH-1 ADN: relación entre amplicón y productos fuera de diana

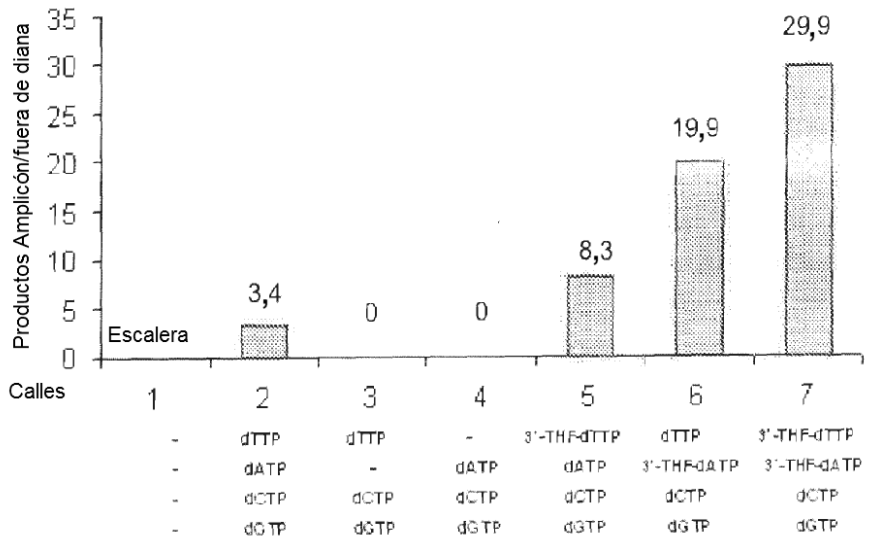


Figura 7

Esquema de procedimiento de PCR GEXL

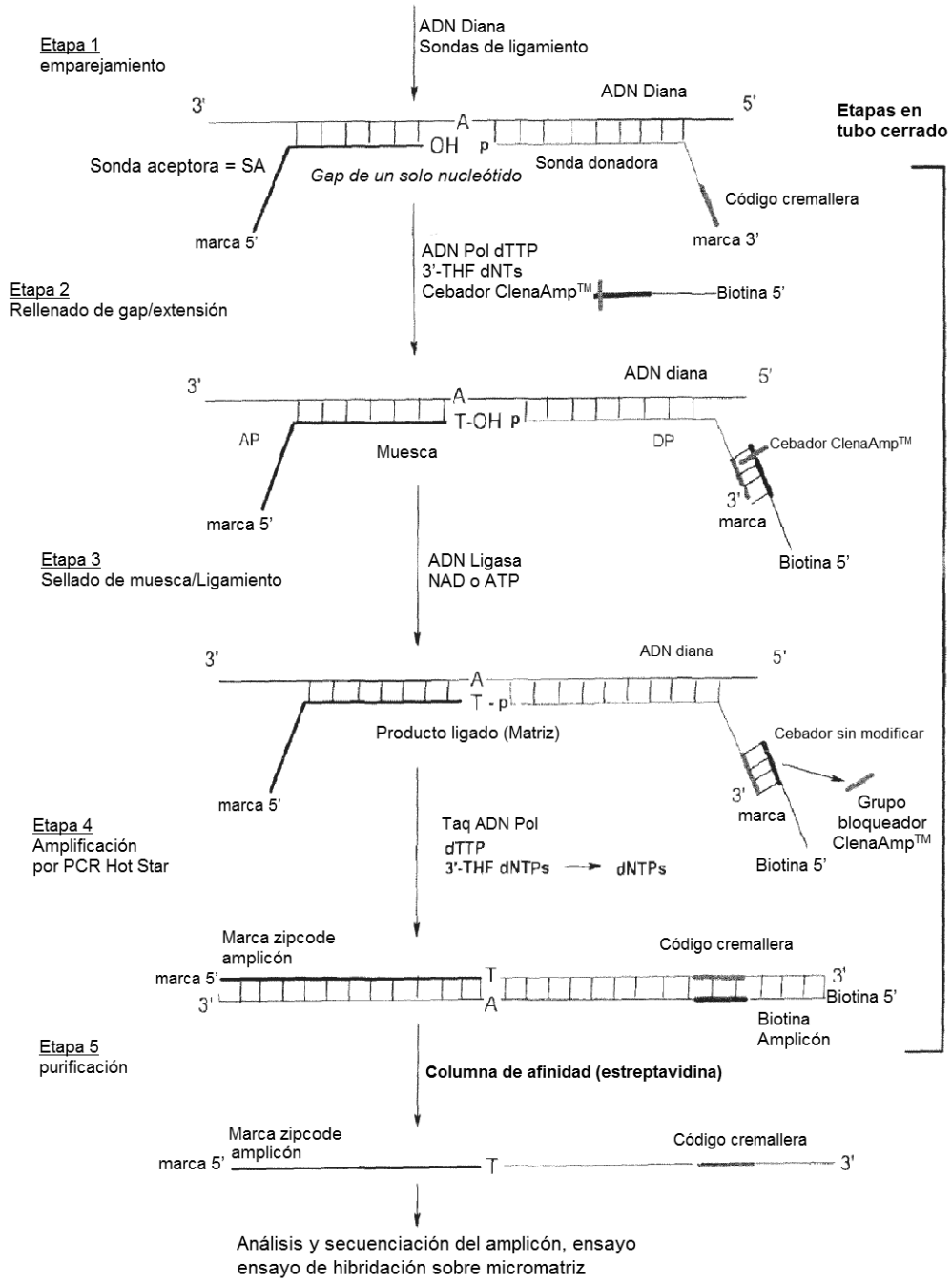


Figura 8