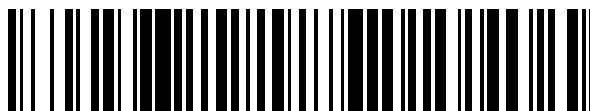


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 109**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6832 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2015 PCT/US2015/023403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2015 E 15721903 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3126372**

54 Título: **Oligómeros polinucleotídicos de timina modificados, y métodos**

30 Prioridad:

30.03.2014 US 201461972389 P

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

07.08.2019

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

**GALL, ALEXANDER A.;
LOKHOV, SERGEY G.;
PODYMINOGIN, MIKHAIL;
VIAZOVKINA, EKATERINA V. y
LUND, KEVIN PATRICK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 722 109 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

Oligómeros polinucleotídicos de timina modificados, y métodos

Campo de la invención

La tecnología aquí pertenece a ácidos nucleicos.

5 Antecedentes de la invención

Los polinucleótidos son útiles en una variedad de aplicaciones tales como la detección de dianas, aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas, secuenciación de ácidos nucleicos, análisis forense, y amplificación de dianas, por ejemplo. Habitualmente, tales aplicaciones requieren polinucleótidos que se hibridan a hebras polinucleotídicas complementarias con una elevada especificidad y sensibilidad, especialmente cuando un ácido nucleico diana está disponible en cantidades limitadas.

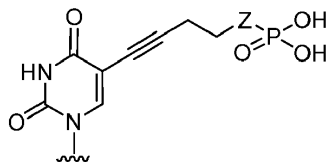
Los análogos nucleotídicos con bases modificadas se han desarrollado para la inclusión en polinucleótidos para cambiar la fortaleza, sensibilidad y/o especificidad de la hibridación, amplificación, y/o detección de ácidos nucleicos. Por ejemplo, Saqui et al. (TETRAHEDRON LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 34, no. 13, 1 de enero de 1993, páginas 2191-2194) describe pirimidinas modificadas con bases que poseen un grupo alquínico en posición 5 y que demuestran una mayor estabilidad del dúplex. No obstante, se necesitan nuevas estructuras químicas y métodos para expandir el conjunto de herramientas disponible para la manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

Breve resumen de la invención

La presente descripción proporciona, entre otros objetos, nuevas bases modificadas similares a timidina de origen no natural (también denominadas aquí como "bases de timina modificadas", o simplemente "bases modificadas") que pueden proporcionar un mejor apareamiento de bases con bases adenínicas o 2,6-diaminopurínicas, oligómeros polinucleotídicos que comprenden tales bases modificadas, y usos de los mismos.

Se ha descubierto que las bases modificadas de la presente descripción, cuando se incorporan en oligómeros polinucleotídicos, incrementan sorprendentemente la afinidad de unión y especificidad de esos oligómeros que las comprenden para la hibridación con secuencias complementarias, en comparación con oligómeros que no contienen tales bases modificadas. Este hallazgo sorprendente permite el uso de oligómeros más cortos o regiones de complementariedad más cortas entre un oligómero y su secuencia diana complementaria. Una ventaja adicional de las bases de timina modificadas de la presente descripción es que pueden potenciar la solubilidad acuosa de los oligómeros que las contienen. Esto puede ser especialmente útil para incrementar la solubilidad de oligómeros de poliácidos nucleicos (PNA), que se sabe bien que son relativamente insolubles en agua en comparación con la solubilidad del ADN y del ARN. La mayor solubilidad en agua (además de la mayor fortaleza de la afinidad de emparejamiento de bases de la timina y del uracilo por bases complementarias tales como adenina durante la hibridación) también puede ser útil para compensar el carácter hidrófobo de fluoróforos aromáticos y restos inhibidores de la fluorescencia, que pueden promover en condiciones acuosas la precipitación o agregación indeseada de oligómeros polinucleotídicos marcados. Además, una o más bases modificadas de la presente descripción puede estar situada en cualquier parte en una secuencia de bases oligomérica, dependiendo de las necesidades particulares de un usuario.

Los oligómeros polinucleotídicos de la presente invención pueden comprender cualquier número de bases modificadas. En algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico comprende al menos una base modificada, en el que la base modificada se representa mediante la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O. En una realización particular de la presente invención, Z es O. Una base modificada como se muestra en la fórmula anterior se denomina aquí como "bases modificadas similares a timidina", "base de timina modificada", o simplemente "base modificada".

Los oligómeros polinucleotídicos de la presente invención pueden comprender cualquier número de restos desoxinucleotídicos. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende al menos un resto desoxirribonucleotídico. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está enlazada covalentemente al resto desoxirribonucleotídico en el oligómero polinucleotídico.

Los oligómeros polinucleotídicos de la presente invención también pueden comprender cualquier número de restos de ácidos nucleicos peptídicos (PNA). En algunas realizaciones, el oligómero polinucleotídico comprende al menos

un resto de ácido nucleico peptídico (PNA). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está enlazada covalentemente al resto de ácido nucleico peptídico en el oligómero polinucleotídico.

5 En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico es una quimera de PNA/ADN, en la que una base de timina modificada de la presente invención está incluida en un segmento de PNA o en un segmento de ADN de la quimera, o tanto un segmento de PNA como un segmento de ADN de la quimera comprende, cada uno, tal base modificada.

10 Los polinucleótidos de la presente invención pueden comprender cualquier número de bases modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende una pluralidad de bases modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende al menos dos bases modificadas. Cuando un oligómero polinucleotídico comprende una pluralidad de bases de timina modificadas, las bases de timina modificadas pueden ser iguales o diferentes.

15 No hay limitación en cuanto a dónde se puede incorporar una base de timina modificada en un oligómero polinucleotídico. En algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico comprende una base de timina modificada en el extremo 3' del oligómero polinucleotídico. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende una base de timina modificada en una base desde el extremo 3' del oligómero polinucleotídico.

Un oligómero polinucleotídico de la presente invención puede comprender uno o más compuestos adicionales. En algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico comprende un ligando de unión al surco menor. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende un intercalador.

20 Un oligómero polinucleotídico preferido de la presente invención es un oligómero polinucleotídico en el que la cadena principal comprende 2'-desoxirribosa o ribosa. Sin embargo, un oligómero polinucleotídico de la presente invención puede comprender una o más modificaciones. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende una modificación de azúcar. Son útiles diversas modificaciones de azúcar. Algunas modificaciones de azúcar no limitantes incluyen arabinosa, d-arabino-hexitol, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, hexosa, o un azúcar bicíclico.

25 Un oligómero polinucleotídico de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de la cadena principal. En algunas realizaciones, el oligómero polinucleotídico comprende una modificación de la cadena principal. En algunas realizaciones, una modificación de la cadena principal se selecciona del grupo que consiste en una cadena principal de fosfato de azúcar modificada, una cadena principal de ácido nucleico bloqueada, una cadena principal peptídica, una cadena principal de fosfotriéster, una cadena principal de fosforamidoato, una cadena principal de siloxano, una cadena principal de éster carboximetílico, una cadena principal de acetamidoato, una
30 cadena principal de carbamato, una cadena principal de tioéter, una cadena principal de fosfonato de metileno en puente, una cadena principal de fosforotioato, una cadena principal de metilfosfonato, una cadena principal de alquilfosfonato, una cadena principal de éster de fosfato, una cadena principal de alquilfosfonotioato, una cadena principal de fosforoditioato, una cadena principal de carbonato, una cadena principal de triéster de fosfato, una
35 cadena principal de éster carboximetílico, una cadena principal de metilfosforotioato, una cadena principal de fosforoditioato, una cadena principal que tiene enlaces p-etoxi, y una combinación de dos o más de cualquiera de las anteriores. En una realización particular de la presente invención, la modificación de la cadena principal es una cadena principal de fosfato de azúcar modificada.

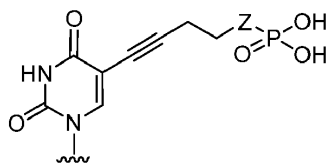
En algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico comprende un nucleótido 3'-terminal que es extensible mediante una enzima de polimerasa dependiente de ADN o de ARN.

40 Un oligómero polinucleotídico de la presente invención puede comprender cualquier número útil de nucleótidos. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende algo menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico comprende de alrededor de 9 a alrededor de 25 nucleótidos, es decir, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

45 Un oligómero polinucleotídico de la presente invención puede comprender uno o más marcadores detectables. En algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico comprende al menos un marcador detectable. Los marcadores detectables no están limitados. En algunas realizaciones, un marcador detectable es un fluoróforo o un inhibidor de la fluorescencia. En algunas realizaciones, el oligómero polinucleotídico comprende un fluoróforo y un inhibidor de la fluorescencia.

50 La presente invención también proporciona métodos para usar una base de timina modificada de la presente descripción en métodos para hibridación. Cualquiera de las bases de timina modificadas descritas aquí se puede usar en un método para hibridación. En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para la hibridación de un oligómero polinucleotídico de la presente invención con una secuencia diana de ácido nucleico que se sospecha que está presente en una mezcla de reacción. En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de incubar una mezcla de reacción que comprende un oligómero polinucleotídico, y que se
55 sospecha que comprende una secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones favorables para la hibridación del oligómero polinucleotídico a la secuencia de ácido nucleico diana si está presente en la mezcla de reacción. El oligómero polinucleotídico usado en ese método es complementario a una secuencia en la secuencia diana de ácido

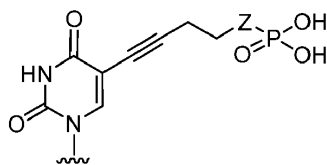
nucleico que se sospecha que está presente en la mezcla de reacción, y comprende al menos una base modificada representada por la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

- 5 La mezcla de reacción se incuba, formando de ese modo un dúplex entre el oligómero polinucleotídico y la secuencia de ácido nucleico diana si está presente en la mezcla de reacción. En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de detectar la presencia, o confirmar la ausencia, de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción. La presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción se detecta como resultado de la formación de tal dúplex. La ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción se confirma como resultado de la falta de formación de tal dúplex. En algunas realizaciones del método, el oligómero polinucleotídico comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un marcador detectable, un fluoróforo, y un inhibidor de la fluorescencia. Un marcador detectable, un fluoróforo y/o un inhibidor de la fluorescencia facilita la detección del dúplex y/o de la secuencia de ácido nucleico diana.

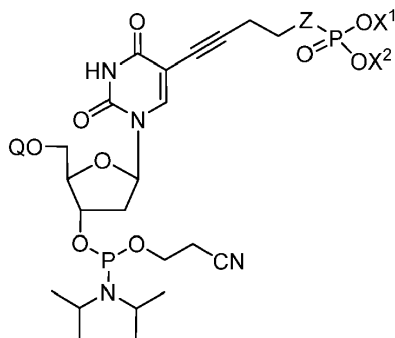
- 15 La presente invención también proporciona dúplex que comprenden cualquier número de oligómeros polinucleotídicos que comprenden una base de timina modificada de la presente invención, en el que el dúplex comprende al menos un oligómero polinucleotídico y una secuencia polinucleotídica. El al menos un oligómero polinucleotídico comprende una base de timina modificada, y cuatro o más bases contiguas que son complementarias con y que se hibridan a al menos cuatro bases contiguas de la secuencia polinucleotídica complementaria. Tales dúplex se pueden formar con cualquier oligómero polinucleotídico de la presente invención.
- 20 En algunas realizaciones, el oligómero polinucleotídico en el dúplex comprende al menos una base modificada representada por la fórmula



en la que Z es CH₂ u O. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

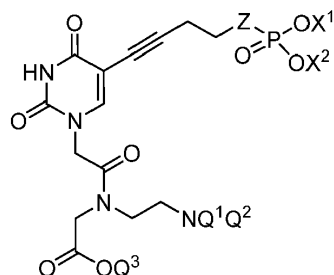
- 25 En algunas realizaciones, el oligómero polinucleotídico en el dúplex comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un marcador detectable, un fluoróforo, y un inhibidor de la fluorescencia. Un marcador detectable, un fluoróforo y/o un inhibidor de la fluorescencia facilita la detección del dúplex y/o de la secuencia polinucleotídica en el dúplex.

En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un fosforamidito nucleosídico modificado, que se representa mediante la fórmula:



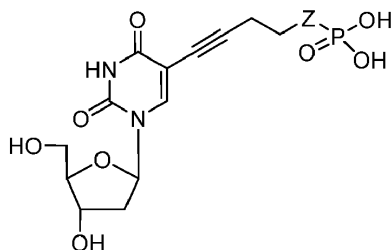
- 30 en la que Z es CH₂ u O; en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores que son iguales o diferentes, o X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado; y en la que Q es un grupo protector de hidroxilo. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

- 35 En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un monómero de ácido nucleico peptídico modificado, que se representa mediante la fórmula:



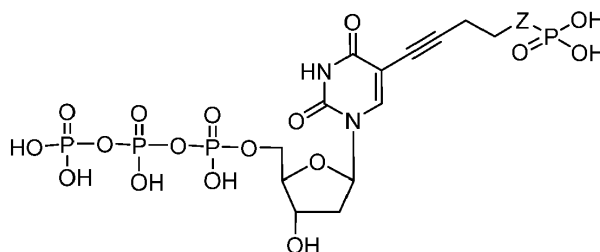
5 en la que Z es CH₂ u O; en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores que son iguales o diferentes, o X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado; en la que Q¹ y Q² son independientemente H o un grupo protector de nitrógeno, o Q¹ y Q², juntos, son un grupo protector de nitrógeno; y en la que Q³ es H o un grupo protector de carboxilo. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un nucleósido de timidina modificado, que se representa mediante la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un 5'-trifosfato de nucleótido de timidina modificado, que se representa mediante la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O. En una realización particular de la presente invención, Z es O.

15 En la descripción que sigue se exponen características y ventajas adicionales de la presente invención. Estas y otras características de la descripción se harán más manifiestas de forma completa a partir de la siguiente descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de los principios expuestos aquí.

Breve descripción de los dibujos

20 Las Figuras 1A y 1B representan esquemáticamente cromatogramas que muestran la absorbancia (260 nm) frente al tiempo tras la HPLC de RP (fase inversa) de mezclas de oligómeros polinucleotídicos (T1, T2 y T1-2). Los oligómeros T1 y T2 comprenden cada uno una base modificada de la presente descripción designada "T^{BP}", y el oligómero T1-2 comprende dos restos T^{BP}. Cada oligómero en la FIG. 1A contiene un grupo protector de 5' dimetoxitritilo (DMT). En la mezcla mostrada en la FIG. 1B, los grupos protectores DMT se han eliminado de los oligómeros. En el Ejemplo 5 y en la Tabla 3 se proporcionan detalles adicionales.

25 La Figura 2 representa esquemáticamente curvas de fusión (representadas gráficamente como la primera derivada de la absorbancia a 270 nm (A²⁷⁰) frente a la temperatura (°C) obtenidas a partir de un oligómero polinucleotídico que comprende cuatro bases modificadas ("T^{BP}"), y a partir de un segundo oligómero polinucleotídico que comprende solamente bases T normales (denominadas "no modificadas"), cada uno hibridado a un polinucleótido de ADN complementario. La figura muestra que el oligómero sustituido con T^{BP} tiene una afinidad de hibridación significativamente más fuerte por una secuencia de ácido nucleico complementaria que la que tiene un polinucleótido de ADN natural de la misma secuencia, que contiene

30

solamente bases T normales de origen natural en lugar de las cuatro bases T^{BP} de origen no natural. En el Ejemplo 6 y en la Tabla 3 se proporcionan detalles adicionales.

Las Figuras 3A y 3B representan esquemáticamente gráficas de fluorescencia (516 nm, FAM (Em)) como una función del número de ciclos obtenido de reacciones de PCR de 5' nucleasas usando sondas fluorescentes que comprenden una a seis sustituciones de T^{BP}, indicadas como Pfl-T-1, Pf1-T-2, Pf1-T-3, Pf1-T-4, y Pf1-T-5 en la FIG. 3A y como Pf1-T-6, Pf1-T-7, y Pf1-T-8 en la FIG. 3B. Pf1 tiene la misma secuencia nucleotídica que las sondas de timina modificadas; sin embargo, comprende solo bases naturales, es decir, base de timina no modificada. En el Ejemplo 7 y en la Tabla 3 se proporcionan detalles adicionales.

La Figura 4 representa esquemáticamente gráficas de fluorescencia (516 nm, FAM (Em)) como una función del número de ciclos obtenido a partir de reacciones de PCR de 5' nucleasa usando una sonda fluorescente y diferentes combinaciones por parejas de tres cebadores directos, comprendiendo cada uno una base modificada T^{BP} cerca del extremo 5', cerca de la posición central, o cerca del extremo 3', y dos cebadores inversos que comprenden solo bases T no modificadas estándar. Las combinaciones por parejas se indican como P1F+P1-1R, P1F+P1R, P1F+P2R, P2F+P1-1R, P2F+P1R, P2F+P2R. En el Ejemplo 8 y en la Tabla 3 se proporcionan detalles adicionales.

La Figura 5 representa esquemáticamente cromatogramas superpuestos de HPLC de RP (fase inversa) (absorbancia (270 nm) frente al tiempo) de cuatro oligómeros polinucleotídicos (un PNA sin modificar y tres oligómeros de PNA modificados: PNA-T1, PNA-T2 y PNA-T3). Los oligómeros T1 y T2 comprenden cada uno una base modificada "T^{BP}" de la descripción, y el oligómero T3 comprende dos restos T^{BP}. En el Ejemplo 12 y en la Tabla 3 se proporcionan detalles adicionales.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que se acompañan, las palabras "comprender" e "incluir", y sus variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye", y "que incluye", se han de interpretar de forma inclusiva. Esto es, estas palabras están destinadas a expresar la posible inclusión de otros elementos o enteros no citados específicamente, cuando lo permita el contexto. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención. Como se usa aquí, la expresión "que consiste en" pretende significar que incluye y se limita a lo que siga a la frase "que consiste en". De este modo, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que pueden no estar presentes otros elementos. La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicados.

Los términos "un" y "una" y "el/la", y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones), se han de interpretar que cubren tanto el singular como el plural, excepto que se indique de otro modo aquí o se contradiga claramente por el contexto.

La cita de intervalos de valores aquí está destinada simplemente a servir como un método taquigráfico de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, excepto que se indique de otro modo aquí, incorporándose cada valor individual en la memoria descriptiva como si se citase individualmente aquí. Los intervalos se pueden expresar aquí como desde "alrededor de" (o "aproximadamente") un valor particular, y/o hasta "alrededor de" (o "aproximadamente") otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde el un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "alrededor de" o "aproximadamente" se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro punto final. También se entiende que hay un número de valores descritos aquí, y que cada valor también se describe aquí como "alrededor de", ese valor particular, además del propio valor. Por ejemplo, si se describe el valor "10", entonces también se describe "alrededor de 10". También se entiende que cuando se describe un valor que es "menor o igual al valor" o "mayor o igual al valor", también se describen los posibles intervalos entre estos valores, como entiende apropiadamente el experto. Por ejemplo, si se describe el valor "10", también se describe el "menor o igual a 10" así como "mayor o igual a 10".

Todos los métodos descritos aquí se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado excepto que se indique de otro modo aquí o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. Además, todos los métodos descritos aquí y que tienen más de una etapa se pueden llevar a cabo mediante más de una persona o entidad. De este modo, una persona o una entidad puede llevar a cabo la etapa (a) de un método, otra persona u otra entidad puede llevar a cabo la etapa (b) del método, y todavía otra persona o todavía otra entidad puede llevar a cabo la etapa (c) del método, etc. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo "tal como") proporcionado

aquí, está destinado simplemente a iluminar mejor la invención, y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención reivindicada de otro modo.

Las unidades, prefijos y símbolos se representan en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Excepto que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi.

Los agrupamientos de elementos y realizaciones alternativas de la invención descritos aquí no se han de interpretar como limitaciones. Cada miembro del grupo se puede citar y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados aquí. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo puede estar incluido en, o se puede eliminar de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce cualquiera de tales inclusiones o eliminaciones, se considera aquí que la memoria descriptiva contiene el grupo como modificado, satisfaciendo así la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones anejas.

Los encabezados usados aquí son solamente para fines de organización, y no se pretende que se usen para limitar el alcance de la descripción o de las reivindicaciones, que se pueden tener como referencia a la memoria descriptiva como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente más abajo se definen de forma más completa con referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Las ilustraciones son para los fines de describir una realización preferida de la invención, y no están destinadas a limitar la invención a ellas.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el significado entendido normalmente por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las siguientes referencias proporcionan a alguien de pericia con una definición general de muchos de los términos usados en esta descripción: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa aquí, los siguientes términos tienen los significados adscritos a ellos, excepto que se especifique de otro modo.

Como se usa aquí, el término "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores de más o menos 10% de un valor especificado. Por ejemplo, la frase "alrededor de 200" incluye más o menos 10% de 200, o de 180 a 220, excepto que se contradiga claramente por el contexto.

Como se usa aquí, el término "amplificación" se refiere a cualquier medio mediante el cual se produce al menos una secuencia parcial de al menos un ácido nucleico diana o su complemento de secuencia, típicamente de manera dependiente del molde, incluyendo, sin limitación, un amplio intervalo de técnicas para amplificar secuencias de ácidos nucleicos, ya sea lineal o exponencialmente. Los métodos de amplificación ejemplares no limitantes incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR de múltiplex, PCR cuantitativa (Q-PCR), amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), reacción de detección de la ligasa (LDR), amplificación de sondas dependiente de ligación múltiplex (MLPA), ligación seguida de amplificación mediante Q-replicasa, extensión de cebadores, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación por desplazamiento de hebra hiperramificada, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación a base de hebra de ácido nucleico (NASBA), amplificaciones multiplexadas de dos etapas, amplificación digital, y similares. Las descripciones de tales técnicas se pueden encontrar, entre otras fuentes, en Ausubel et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, Diftenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (2002); e Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990).

Como se usa aquí, las expresiones "condición de amplificación" o "condición de extensión", que se usan aquí de forma intercambiable, se refieren a condiciones en las que una polimerasa puede añadir uno o más nucleótidos al extremo 3' de un polinucleótido. Tales condiciones de amplificación o extensión son bien conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press y Ausubel, et al, Current Protocols in Molecular Biology, 1987-2007, John Wiley & Sons.

Como se usa aquí, el término "matriz" o "micromatriz" se refiere en general a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, tales como sondas polinucleotídicas, sobre un sustrato. Una "matriz" es típicamente una colección espacial o lógicamente organizada, por ejemplo, de secuencias oligonucleotídicas o productos de secuencias nucleotídicas tales como ARN o proteínas codificados por una secuencia oligonucleotídica. El elemento de la matriz puede ser un oligonucleótido, un fragmento de ADN, un polinucleótido, o similar. El elemento de la matriz puede incluir cualquier elemento inmovilizado sobre un soporte sólido que es capaz de unirse con especificidad a una secuencia dada, de manera que se pueda determinar la expresión del gen, ya sea cualitativa o cuantitativamente. Las matrices oligonucleotídicas de alta densidad son particularmente útiles para determinar

perfiles de expresión de genes para un gran número de ARN en una muestra. Los elementos de la matriz se pueden preparar sintética o biosintéticamente. Los elementos de la matriz pueden ser idénticos o diferentes entre sí. La matriz puede asumir una variedad de formatos, por ejemplo bibliotecas de moléculas solubles; bibliotecas de compuestos unidos a perlas de resina, chips de sílice, u otros soportes sólidos. La matriz podría ser una macromatriz o una micromatriz, dependiendo del tamaño de las manchas de muestra en la matriz. Una macromatriz contiene generalmente tamaños de manchas de muestra de alrededor de 300 micrómetros o mayores, y se puede formar fácilmente su imagen mediante escáneres de gel y de transferencia. Una micromatriz contendría generalmente tamaños de mancha de menos de 300 micrómetros. Una matriz de múltiples pocillos es un soporte que incluye múltiples cámaras para contener manchas de muestras. Un elemento de matriz preferido es un oligómero polinucleotídico modificado de la presente descripción. Las moléculas preferidas en una matriz son oligómeros polinucleotídicos modificados de la presente invención.

Como se usa aquí, las expresiones “unir a” o “unido a”, o sus equivalentes gramaticales, significan asegurado en, asegurado junto, fijado a, montado a, montado en, conectado a o unido. “Unión” significa el acto de unir, o la condición de estar unido. La unión puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, una parte A se puede unir directamente a la parte B. Como alternativa, la parte A se puede unir indirectamente a la parte B uniendo en primer lugar la parte A a la parte C, y uniendo después la parte C a la parte B. Se puede usar más de una parte intermedia para unir la parte A a la parte B. La unión puede ser permanente, temporal, o durante un tiempo prolongado. Por ejemplo, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención se puede unir a un soporte sólido o matriz temporalmente durante el tiempo necesario para llevar a cabo un método de la invención o una etapa de un método de la invención. Como alternativa, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención se puede unir a un soporte sólido o matriz durante un tiempo prolongado, por ejemplo, también cuando no se lleva a cabo un método de la presente invención o una etapa del método de la presente invención. También, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención se puede unir permanentemente a un soporte sólido o a una matriz.

Como se usa aquí, el término “base” significa cualquier resto heterocíclico que contiene nitrógeno capaz de formar enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick con una base nucleotídica o análogo de base nucleotídica complementarios, por ejemplo una purina, una 7-desazapurina, o una pirimidina. Las bases típicas son las bases de origen natural adenina, citosina, guanina, timina, y uracilo. Las bases también incluyen análogos de bases de origen natural, tales como desazaadenina, 7-desaza-8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-desaza-8-azaguanina, inosina, nebularina, nitropirrol, nitroindol, 2-aminopurina, 2,6-diamino-purina, hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-cloro-6-aminopurina, xantina, hipoxantina, etc.

Como se usa aquí, el término “perla” significa “una pequeña masa con un aspecto o superficie algo redondeados, tal como una masa con forma esférica, cilíndrica, elíptica, ovalada, o de cúpula.

Como se usa aquí, la expresión “fluido biológico” se refiere a un fluido procedente de un hospedante, e incluye sangre completa, suero, plasma, orina, lágrimas, fluido ascítico mucosal, fluido oral, semen, heces, esputo, fluido cerebroespinal, y fluido fetal. Un fluido biológico puede incluir células, o puede estar desprovisto de células.

Como se usa aquí, la expresión “muestra biológica” significa una muestra de tejido biológico o de fluido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos. Tales muestras son típicamente de seres humanos, pero incluyen tejidos aislados de primates no humanos, o de roedores, por ejemplo ratones, y ratas. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como biopsia quirúrgica, biopsia de aspiración con aguja fina y muestras de autopsia, secciones congeladas tomadas con fines histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, cabello, piel, etc. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes. Una “muestra biológica” también se refiere a una célula o población de células, o una cantidad de tejido o fluido, procedente de un animal. Lo más a menudo, la muestra biológica se ha retirado de un animal, pero la expresión “muestra biológica” también se puede referir a células o tejido analizados *in vivo*, es decir, sin retirarlos del animal. Típicamente, una “muestra biológica” contendrá células del animal, pero la expresión también se puede referir a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva, u orina, que se puede usar para medir el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido. En la presente invención se pueden usar numerosos tipos de muestras biológicas, incluyendo, pero sin limitarse a, una biopsia tisular o una muestra de sangre. Como se usa aquí, una “biopsia tisular” se refiere a una cantidad de tejido retirado de un animal, preferiblemente un mamífero, más preferible un primate, y lo más preferible un ser humano. Una “muestra biológica” engloba muestras que se han manipulado de cualquier forma tras su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, lavado, tratado para producir una muestra de ácido nucleico (una muestra que comprende ácido nucleico adecuado para manipulaciones posteriores), o enriquecimiento en busca de ciertas poblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4⁺, gliocitos, macrófagos, células tumorales, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y similares. La expresión “muestra biológica” engloba una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, muestras tisulares, órganos, médula ósea, y similares. Como se usa aquí, “proporcionar una muestra biológica” significa obtener una muestra biológica para uso en los métodos descritos en esta descripción. Lo más a menudo, esto se hará retirando una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr usando células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento, y/o para otro fin). Serán particularmente útiles los tejidos de archivo, que tienen un

historial de tratamiento o de resultado. Una muestra biológica también se puede derivar de un animal que tiene un tumor de xenoinjerto implantado procedente de un paciente, otro animal o una estirpe celular cancerosa.

Como se usa aquí, el término “complementario” se refiere a la capacidad de las secuencias oligoméricas para hibridarse a y formar pares de bases entre sí. Los pares de bases se forman típicamente mediante enlaces de hidrógeno entre unidades nucleotídicas en hebras polinucleotídicas (oligoméricas) antiparalelas. Las hebras oligoméricas polinucleotídicas complementarias pueden emparejarse en sus bases a la manera de Watson-Crick (por ejemplo, A a T, A a U, C a G), o en cualquier otra manera que permita la formación de dúplex. El porcentaje de “complementariedad” de una secuencia sonda a una secuencia diana es el porcentaje de “identidad” de la secuencia sonda a la secuencia de la diana, o al complemento de la secuencia de la diana. En la determinación del grado de “complementariedad” entre una sonda y una secuencia diana, el grado de “complementariedad” se expresa como el porcentaje de identidad entre la secuencia de la sonda y la secuencia de la secuencia diana o el complemento de la secuencia de la secuencia diana que se alinea mejor con ella. Una sonda ejemplar es un oligómero oligonucleotídico como se describe aquí.

Como se usa aquí, el término “diferente” significa no el mismo, no de la misma identidad.

Como se usa aquí, el término “dúplex” se refiere a un complejo de hibridación bicatenario formado apareando (hibridando) oligómeros polinucleotídicos monocatenarios complementarios (o parcialmente complementarios), por ejemplo ADN, ARN, o PNA.

Los términos “hibridar” o “hibridación” se usan aquí con referencia a “hibridación específica”, que es la unión, formación de dúplex, o apareamiento de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia nucleotídica particular, en algunas realizaciones, en condiciones restrictivas. La expresión “condiciones restrictivas” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará preferentemente a su secuencia diana, y en menor grado a, o nada en absoluto a, otras secuencias. “Hibridación restrictiva” y “condiciones de lavado de hibridación restrictivas”, en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos, dependen de las secuencias, y son diferentes bajo parámetros medioambientales diferentes. Por ejemplo, en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, Ch. 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,”* Elsevier, NY, se encuentra una amplia guía de la hibridación de ácidos nucleicos. En general, las condiciones de hibridación y de lavado muy restrictivas para filtrar hibridaciones se seleccionan para que estén alrededor de 5°C más bajas que el punto de fusión térmico, también denominado como “temperatura de fusión térmica” o “ T_m ” para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La dependencia de la restricción de hibridación con respecto a la composición del amortiguador, la temperatura, y la longitud de la sonda, es bien conocida por aquellos de pericia en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.)* Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY). El grado de hibridación de un oligómero (u oligómero polinucleotídico) a una secuencia diana, también conocido como fuerza de hibridación, se determina mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Un método preferido es determinar la T_m de un dúplex híbrido dado. Esto se puede lograr sometiéndolo en disolución un dúplex formado a una temperatura gradualmente creciente, y monitorizando la desnaturalización del dúplex, por ejemplo mediante absorbancia de luz ultravioleta, que aumenta con el desapilamiento de los pares de bases que acompaña a la desnaturalización. La T_m se define generalmente como la temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN están en el estado monocatenario (ADN_{mc}). La T_m depende de diversos parámetros, tal como la longitud de la secuencia de la hebra complementaria hibridada, sus secuencias nucleotídicas específicas, las composiciones de las bases, y las concentraciones de las hebras complementarias.

Como se usa aquí, el término “marcador” o “marcador detectable” se refiere a un resto que, cuando se une a una biomolécula, un nucleósido, un nucleótido, o un oligómero polinucleotídico, hace a tal biomolécula, nucleósido, nucleótido, u oligómero polinucleotídico, detectable por medios de detección adecuados. Los marcadores ejemplares incluyen fluoróforos, cromóforos, radioisótopos, marcadores de spin, marcadores enzimáticos, marcadores quimioluminiscentes, compuestos electroquimioluminiscentes, marcadores magnéticos, microesferas, metal coloidal, marcadores inmunológicos, ligandos, enzimas, y similares. En algunas realizaciones, los marcadores son colorantes fluorescentes, tales como colorantes de tipo fluoresceína o de tipo rodamina. En algunas realizaciones, un marcador se selecciona del grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, estreptavidina, biotina, un epítipo reconocido por un anticuerpo, y sus equivalentes.

“Nucleótido no coincidente” se usa aquí con referencia a un nucleótido en una secuencia de interés que no es complementario al nucleótido correspondiente en una secuencia correspondiente cuando la secuencia de interés y la secuencia diana se hibridan, por ejemplo en una reacción de amplificación. El complemento de C es G, y el complemento de A es T. En otras palabras, una “C” en una secuencia de interés se considera que no es coincidente con una “T”, “C” o “A” en una secuencia diana.

Como se usa aquí, las expresiones “base nucleotídica modificada” o “base modificada” se refieren a una base que no tiene la estructura de una base de origen natural, y de este modo es de origen no natural. Una base modificada preferida descrita aquí es, por ejemplo, una base timínica modificada o una base modificada similar a timidina.

Como se usa aquí, los términos “oligómero polinucleotídico modificado”, “oligómero oligonucleotídico modificado”, y “oligómero modificado”, se refieren a un oligómero polinucleotídico de la invención que comprende al menos una base modificada. Una base modificada preferida descrita aquí es, por ejemplo, una base de timina modificada o una base modificada similar a timidina. Las expresiones “oligómero polinucleotídico modificado”, “oligómero oligonucleotídico modificado”, y “oligómero modificado”, que se considera que son intercambiables como se usan aquí, también se refieren a polímeros lineales de formas modificadas de origen no natural de un oligómero polinucleotídico, un oligómero oligonucleotídico, o un oligómero, incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos bicatenarios y monocatenarios, ribonucleótidos, formas alfa-anoméricas de los mismos, y similares. Un oligómero polinucleotídico modificado preferido de la presente invención es aquel que comprende una base de timina modificada. Un oligómero polinucleotídico modificado puede estar compuesto totalmente de desoxirribonucleótidos, de ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, o puede contener bloques o mezclas de dos o más tipos de monómeros diferentes. Estas expresiones también engloban secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN, también denominados como “análogos oligonucleotídicos” o “análogos de ácidos nucleicos”. Una variedad de referencias describen tales análogos de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, fosforamidoato (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) y referencias allí; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 (1986)), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y patente U.S. n° 5.644.048), fosforditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), enlaces de O-metilfosforamidoato (véase, Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (véanse Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature* 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); cadenas principales no iónicas (patentes U.S. n°s 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowski et al., *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); Capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas principales no de ribosa, incluyendo las descritas en las patentes U.S. n°s 5.235.033 y 5.034.506, y Capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. También se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carboxílicos (véase Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* p. 169 176 (1995)). En Rawls, *C & E News* junio 2, 1997, página 35, se describen varios análogos de ácidos nucleicos.

Como se usa aquí, la expresión “de origen natural”, en el contexto de moléculas de ácidos nucleicos, se refiere a una molécula de ARN o de ADN (monocatenaria o bicatenaria) que tiene una secuencia nucleotídica que aparece en la naturaleza, y que comprende solamente componentes, tales como bases, nucleósidos, y nucleótidos, que aparecen en la naturaleza.

Como se usa aquí, el término “nucleósido” se refiere a una molécula que consiste en una base nitrogenada del tipo mencionado aquí, que está unida a un azúcar de ribosa o de desoxirribosa vía un enlace beta-glicosídico. Los ejemplos de nucleósidos incluyen adenosina, citidina, guanosina, timidina, uridina e inosina. Típicamente, cuando la base es A o G, el azúcar de ribosa está unido a la posición N⁹ de la base. Cuando la base es C, T o U, el azúcar de ribosa está unido a la posición N¹ de la base (Kornberg y Baker, *DNA Replication*, 2^a Ed., Freeman, San Francisco, Calif., (1992)).

Como se usa aquí, el término “nucleótido” significa un éster de fosfato de un nucleósido, ya sea como un monómero independiente o como una subunidad en un polinucleótido. Los monómeros nucleotídicos incluyen, por ejemplo, 5'-monofosfato, 5'-difosfato, 5'-trifosfato, y 3'-monofosfato de nucleótido. Los trifosfatos de nucleótido se representan algunas veces como NTP”, “dNTP” (2'-desoxipentosa) o “ddNTP” (2',3'-didesoxipentosa), para señalar particularmente las características estructurales del azúcar de ribosa. “5'-trifosfato de nucleótido” se refiere a un nucleótido con un grupo éster de trifosfato en la posición 5'. El grupo éster de trifosfato puede incluir sustituciones de azufre por uno o más átomos de oxígeno del fosfato, por ejemplo 5'-trifosfatos de alfa-tionucleótido. Un monofosfato, difosfato o trifosfato de nucleótido puede servir como el sustrato para una enzima que procesa un ácido nucleico, que cataliza modificaciones de ácidos nucleicos o intermedios de ácidos nucleicos.

Como se usa aquí, la expresión “enzima que procesa un nucleótido” se refiere a una enzima que modifica o procesa un nucleótido, un oligonucleótido o un ácido nucleico, e incluye, pero no se limita a, una enzima de extensión de cebador, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una enzima de restricción, una enzima formadora de muesca, una enzima de reparación, y una enzima de ligación.

Como se usa aquí, el término “pluralidad” significa más de uno. Por ejemplo, una pluralidad de oligómeros polinucleotídicos modificados significa al menos dos oligómeros polinucleotídicos modificados, al menos tres oligómeros polinucleotídicos modificados, o al menos cuatro oligómeros polinucleotídicos modificados, y similares. Si una realización de la presente invención comprende más de un oligómero polinucleotídico modificado, también se pueden denominar como un primer oligómero polinucleotídico modificado, un segundo oligómero polinucleotídico modificado, un tercer oligómero polinucleotídico modificado, etc.

Como se usa aquí, la expresión “oligómero polinucleotídico”, “oligómero oligonucleotídico” y “oligómero”, que se consideran que son intercambiables como se usan aquí, se refieren a polímeros lineales de monómeros nucleotídicos de origen natural que son diferentes del “oligómero polinucleotídico modificado”, “oligómero oligonucleotídico modificado”, y “oligómero modificado” de la presente invención. Habitualmente, los monómeros nucleosídicos de un “oligómero polinucleotídico” están enlazados mediante enlaces de fosfodiéster. Sin embargo, también se contemplan oligómeros polinucleotídicos modificados que no contienen enlaces de fosfodiéster. “Oligómero polinucleotídico modificado” también engloba polímeros que contienen uno o más monómeros de origen no natural y/o enlaces entre subunidades, tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNAs, por ejemplo polímeros que comprenden una cadena principal de subunidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas a amida, a la que se unen nucleobases vía los nitrógenos de la cadena principal no amídicos. Véase Nielsen et al., Science 254:1497-1500 (1991)). Los oligómeros polinucleotídicos y los oligómeros polinucleotídicos modificados oscilan típicamente en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo 8-40, a varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un oligómero polinucleotídico u oligómero polinucleotídico modificado se represente mediante una secuencia de letras, tal como “ATGCCTG”, se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5'→3' desde la izquierda a la derecha, y que “A” representa adenosina, “C” representa citidina, “G” representa guanosina, “T” representa timidina, y “U” representa uridina, excepto que se señale de otro modo. Para cadenas principales que no tienen un extremo 5' y/o 3' convencional (por ejemplo, PNAs), la secuencia de bases se proporciona como si estuvieran en un orden 5'→3', de manera que la secuencia se hibridaría de una manera antiparalela a una secuencia complementaria que tenga una orientación 3'→5', como es el caso en las hebras complementarias antiparalelas de ADN bicatenario normal.

Quando se usa solo, “polinucleótido” y “oligonucleótido” se refiere a oligómeros polinucleotídicos compuestos principal o totalmente de unidades monoméricas convencionales de ADN o de ARN – es decir, de anillos de azúcar de desoxirribosa o de ribosa sustituidos con bases A, C, G, T o U, y que están enlazados mediante restos de cadenas principales de fosfato convencionales.

Como se usa aquí, el término “cebador” se refiere a un oligómero u oligómero modificado que es eficaz como punto de partida para sintetizar una hebra polinucleotídica que es complementaria a una hebra de ácido nucleico diana. Por ejemplo, los cebadores para uso en PCR comprenden un cebador directo e inverso, en los que el cebador directo contiene una secuencia complementaria a una región de una hebra de ácido nucleico diana, y guía la síntesis de una hebra complementaria. Un cebador inverso contiene una secuencia complementaria a la hebra opuesta, y guía la síntesis a lo largo de la hebra opuesta de la hebra de ácido nucleico diana.

Como se usa aquí, el término “sonda” se refiere a un oligonucleótido marcado u oligonucleótido modificado marcado que contiene una secuencia complementaria a una región de una secuencia de ácido nucleico diana, que permite a la sonda formar un dúplex con la secuencia diana y generar una señal detectable que indica la presencia de la región de la secuencia diana. Una señal detectable se genera durante o después de la hibridación, ya sea directa o indirectamente. En algunas aplicaciones, tal como durante la extensión del cebador en PCR de 5'-nucleasa, las sondas carecen de un grupo 3'-hidroxilo extensible, para evitar la extensión de la sonda mediada por polimerasa.

Un “cebador” o “sonda” es típicamente un oligómero o un oligómero modificado que comprende una región que es complementaria a una secuencia de al menos 6 nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico diana, aunque los cebadores y las sondas pueden comprender algo menos de 6 nucleótidos contiguos. En algunas realizaciones, se proporciona un oligómero modificado que comprende una secuencia que es idéntica a, o complementaria a, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, 20 o más, 21 o más, 22 o más, 23 o más, 24 o más, 25 o más, alrededor de 50 o más, o hasta alrededor de 100 nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico diana. Cuando un cebador o sonda comprende una región que es “complementaria” a al menos x nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico diana, el cebador o sonda es al menos 95% complementario a al menos x nucleótidos contiguos de la molécula de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el cebador o sonda es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% complementario a la molécula de ácido nucleico diana. Una “sonda” o “cebador” preferido es una “sonda” o “cebador” que comprende una base modificada, preferiblemente una base de timina modificada.

Como se usa aquí, las expresiones “grupo protector”, “grupo protector”, o “forma protegida”, se refiere a una modificación química lábil de un grupo funcional (es decir, un grupo fosfato o un grupo fosfonato) destinada a preservar su funcionalidad y/o a obtener quimioselectividad en una reacción química subsiguiente. Un grupo protector se elimina del producto final mediante un tratamiento desprotector (por ejemplo, tratamiento con amoníaco acuoso concentrado). En algunas realizaciones, los grupos protectores fosfato y fosfonato X¹ y X² se seleccionan independientemente de grupos protectores usados para la protección de reactivos fosfílicos en la síntesis de oligonucleótidos mediante fosforamidito automatizada, y/o son compatibles con las condiciones de la síntesis de oligonucleótidos mediante fosforamidito automatizada. En ciertas realizaciones, los grupos X¹ y X² son independientemente bencilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cianoetilo), y heteroalquilo opcionalmente sustituido. Los grupos protectores de amino ejemplares incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), terc-butoxicarbonilo (Boc), trimetilo sililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), y nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC). Los ejemplos protectores de hidroxilo ejemplares incluyen aquellos en los que el

grupo hidroxilo se acetila o se alquila, tales como éteres de bencilo y de tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropiraniolo, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. Véase también, Chapter 1: Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis por Etienne Sonveaux en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 26, *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, S. Agrawal (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ (1994); *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, P. Wutz and T. Greene (Eds.), Wiley-Interscience, 4ª Edición (2006); Thomson, S.A., et al., "Fmoc Mediated Synthesis of Peptide Nucleic Acids", *Tetrahedron* 51:6179-6194 (1995); y "Solid-Phase Synthesis of Peptide Nucleic Acids", *J. Peptide Science* 3:175-183 (1995).

Como se usa aquí, el término "sal" se refiere a sales de un compuesto, tal como un resto modificado descrito aquí, que se prepara con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos aquí. Cuando los compuestos de la presente descripción contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de bases poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente descripción contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácidos poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico, y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., 1977, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 66:1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente descripción contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que el compuesto se convierta en sales de adición de bases o de ácidos. Las formas neutras de un compuesto se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o ácido, y aislando el compuesto progenitor de la manera convencional. La forma progenitora del compuesto difiere de las diversas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero de otro modo las sales son equivalentes a la forma progenitora del compuesto para los fines de la presente descripción.

Como se usa aquí, la expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier material insoluble, incluyendo partículas (por ejemplo, perlas), fibras, monolitos, membranas, filtros, tiras de plástico, matrices, y similares.

Como se usa aquí, la expresión "sustancialmente complementaria" se refiere a una secuencia que no tiene más de 20% (por ejemplo, no más de 15%, 10% o 5%) de los nucleótidos en la secuencia en cuestión no coincidentes con una secuencia diana. En algunas realizaciones, las hebras complementarias de un complejo de hibridación tienen 1, 2, 3, 4, 5, o más faltas de coincidencia nucleotídica.

Como se usa aquí, las expresiones "ácido nucleico diana" o "molécula de ácido nucleico diana" se refieren a un ácido nucleico u oligómero polinucleotídico que, en algunas realizaciones, es la diana para la hibridación, amplificación, etc., es decir, para fines de detección. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana comprenden ARN o ADN que es parcial o totalmente complementario a un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención.

Como se usa aquí, las expresiones "secuencia diana", "secuencia de ácido nucleico diana" o "secuencia nucleotídica diana" se refiere a una secuencia dentro de un ácido nucleico diana. La secuencia diana se puede describir habitualmente usando las cuatro bases de ADN (A, T, G, y C), o las cuatro bases de ARN (A, U, G, y C).

II. Composiciones

La descripción proporciona oligómeros polinucleotídicos que comprenden una o más bases modificadas ("oligómeros polinucleotídicos modificados") que exhiben propiedades de hibridación mejoradas y que son útiles en reacciones de hibridación y como sustratos para enzimas polimerasas. La descripción se refiere además al uso de tales oligómeros polinucleotídicos modificados como sondas y/o como cebadores, y en matrices nucleotídicas, por ejemplo.

Se proporcionan además composiciones, métodos y kits que comprenden tales oligómeros polinucleotídicos modificados. Los oligómeros polinucleotídicos modificados proporcionan una estabilidad superior en el emparejamiento de bases entre los oligómeros polinucleotídicos modificados y las secuencias polinucleotídicas complementarias, en comparación con los oligómeros que carecen de tales bases modificadas.

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados descritos aquí comprenden oligómeros de ADN, ARN, PNA y oligómeros quiméricos de ADN/PNA. Las bases modificadas y los oligómeros polinucleotídicos modificados de la invención proporcionan una mayor estabilidad del dúplex para secuencias complementarias, y una

discriminación mejorada de la falta de coincidencia cuando está presente una o más faltas de coincidencia de bases en un complejo de hibridación.

También se proporcionan nucleósidos y nucleótidos que contienen bases modificadas de la presente descripción. Tales nucleósidos se pueden usar como precursores para la síntesis de los ésteres de mono-, di- y trifosfato correspondientes, o como sustratos enzimáticos. Los nucleótidos de la invención se pueden incorporar en oligómeros polinucleotídicos mediante extensión de los cebadores mediada por polimerasas.

5

Más abajo se explican con detalle diversas realizaciones de la descripción. Aunque se explican implementaciones específicas, se debería entender que esto se hace solamente para fines ilustrativos.

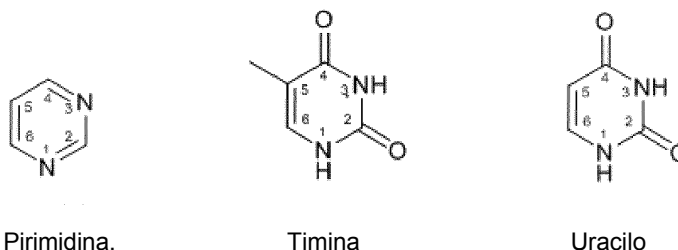
A. Bases similares a timidina modificadas

10 La descripción proporciona oligómeros polinucleotídicos que comprenden una o más bases modificadas que exhiben propiedades de hibridación mejoradas y que son útiles en reacciones de hibridación y como sustratos para enzimas polimerasas. Las bases modificadas de la presente descripción son de origen no natural.

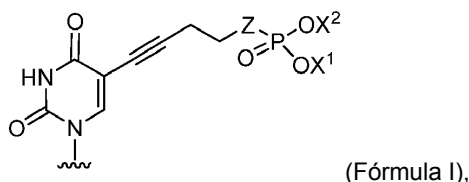
15

Las bases modificadas descritas aquí comprenden un grupo fosfato o fosfonato enlazado mediante un resto enlazador a la posición 5 de una estructura anular de pirimidina. Se puede considerar que las bases modificadas de la presente descripción son análogos de las bases convencionales timina y uracilo. Con respecto a timina, el sustituyente 5-metilico de timina se sustituye por un resto de fosfato enlazador o de fosfonato enlazador, como se muestra adicionalmente más abajo. Con respecto a uracilo, el hidrógeno en 5 se sustituye por el resto de fosfato enlazador o fosfonato enlazador. En la presente descripción, las bases modificadas se representan algunas veces como bases de timina modificadas (por ejemplo, T^{BP} o T^{PP}), pero también se pueden representar como bases de uracilo modificadas, si se desea:

20



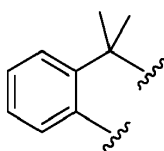
Las bases modificadas de la presente descripción se pueden representar generalmente mediante la fórmula:



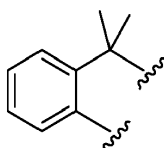
25

en la que Z es CH₂ u O; y X¹ y X² son independientemente H o un grupo protector, o juntos son un grupo protector, y la línea ondulada indica el punto de unión de la base modificada a una cadena principal oligomérica o a un resto de cadena principal monomérica, tal como un anillo de ribosa de un desoxirribonucleósido, un anillo de ribosa de un desoxirribonucleótido, o la cadena principal de un monómero de aminoácido de PNA. Cuando tanto X¹ como X² son grupos protectores, X¹ y X², tomados separadamente, pueden ser iguales o diferentes, y X¹ y X², tomados juntos, pueden ser un grupo protector bidentado, tal como α,α-dimetil-o-bencileno:

30



Una base modificada particular de la presente descripción según la Fórmula I es una base modificada en la que Z es O y X¹ y X², tomados juntos, son α,α-dimetil-o-bencileno:



En Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. Wutz and T. Greene (Eds.), Wiley-Interscience, 4ª Edición, 2006, se puede encontrar una ilustración adicional de grupos protectores de fosfato y fosfonato, y su método de introducción.

5 Típicamente, tanto X^1 y X^2 son grupos protectores cuando es deseable proteger el resto de fosfato o de fosfonato del daño o modificación durante la síntesis oligomérica, como en el caso de la síntesis de un oligómero polinucleotídico mediante el método de fosforamidito, o de un oligómero de PNA mediante síntesis peptídica. En los oligómeros polinucleotídicos de la invención que contienen bases modificadas, los grupos protectores se eliminan típicamente antes de que el oligómero se use para hibridarlo a un oligómero polinucleotídico complementario, a fin de proporcionar una afinidad de emparejamiento de bases y una solubilidad acuosa incrementadas. Preferiblemente, siempre que X^1 , X^2 , o ambos, sean un grupo protector, o sean grupos protectores, el grupo o grupos protectores son eliminables mediante tratamiento con amoníaco.

En algunas realizaciones en las que Z es O, la base modificada comprende un resto de fosfato.

En algunas realizaciones en las que Z es CH_2 , la base modificada comprende un resto de fosfonato.

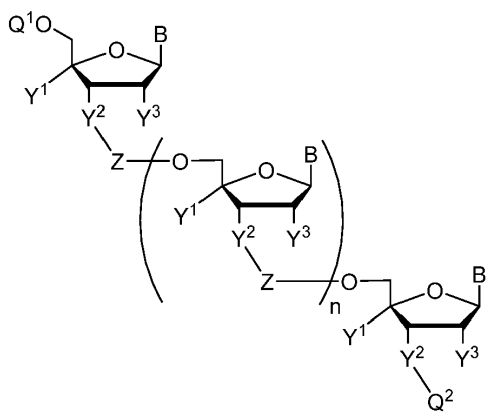
15 Como se describe adicionalmente más abajo, los oligómeros polinucleotídicos modificados, los fosforamidatos, los monómeros de PNA modificados, los nucleósidos modificados, y los nucleótidos modificados de la presente invención comprenden una o más de las bases modificadas descritas anteriormente (Fórmula I).

B. Oligómeros polinucleotídicos modificados

20 La descripción proporciona oligómeros polinucleotídicos que comprenden una o más bases modificadas que exhiben propiedades mejoradas de hibridación y son útiles en reacciones de hibridación y como sustratos para enzimas polimerasas. Se denominan aquí como "oligómeros polinucleotídicos modificados", y son de origen no natural. La descripción se refiere además al uso de tales oligómeros polinucleotídicos modificados como sondas y/o cebadores y en matrices nucleotídicas, por ejemplo.

25 En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados descritos aquí comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más bases modificadas según la fórmula anterior (véase la Fórmula I). El número de bases modificadas dentro de un oligómero polinucleotídico modificado dependerá del número de bases T en la secuencia oligomérica, y de la cantidad de incremento de afinidad de unión que se desee, que se puede determinar, como se describe aquí, mediante estudios de fusión u otros experimentos sobre diferentes constructos oligoméricos para determinar qué es óptimo para las necesidades de una aplicación particular.

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados se representan mediante la fórmula:



30 en la que cada Y^1 es independientemente H, alquilo de C_1-C_8 , o está combinado opcionalmente con Y^3 para formar un anillo de 5 a 7 miembros;

en la que cada Y^2 es independientemente O, S, o NH;

en la que cada Y^3 es independientemente H, F, u OR^a ;

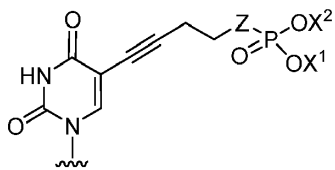
35 en la que cada R^a es independientemente H, alquilo de C_1-C_8 , o un grupo protector de hidroxilo;

en la que cada Z es independientemente P(O)OH , P(S)OH o P(O)CH_3 ;

en la que n es 1-98;

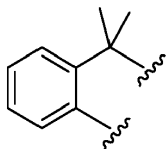
en la que Q^1 y Q^2 son cada uno, independientemente, H, monofosfato, difosfato, trifosfato, un colorante informador fluorescente, o un inhibidor, preferiblemente un inhibidor de la fluorescencia;

en la que cada B es independientemente adenina, guanina, citosina, timina, uridina, diaminopurina, con la condición de que al menos un B sea una base modificada representada por la fórmula:



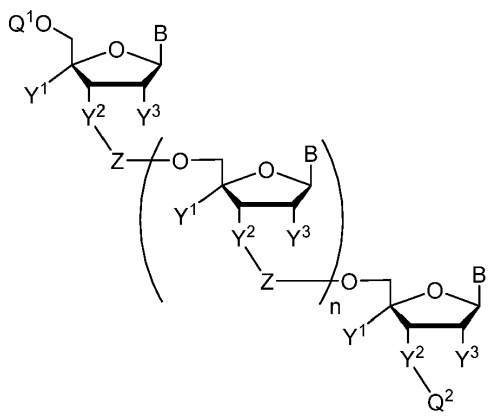
(Fórmula I),

- 5 en la que Z es CH₂ u O; y en la que X¹ y X² son iguales o diferentes, y tomados separadamente, son H o un grupo protector, o X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado, tal como α,α-dimetil-o-bencileno:



En algunas realizaciones, X¹ y X² son H. En algunas realizaciones, Z es O. En algunas realizaciones, Z es CH₂.

En una realización particular, un oligómero polinucleotídico modificado se representa mediante la fórmula:

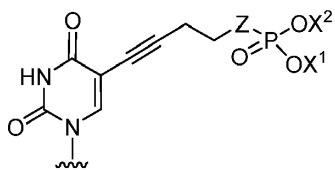


- 10 en la que cada Y¹ es H;
 en la que cada Y² es O;
 en la que cada Y³ es H;
 en la que cada R^a es H;
 en la que cada Z es P(O)OH;

- 15 en la que n es 1-98;

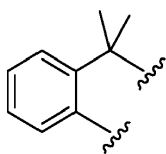
en la que Q¹ y Q² son cada uno, independientemente, H, monofosfato, difosfato, trifosfato, un colorante informador fluorescente, o un inhibidor, preferiblemente un inhibidor de la fluorescencia;

en la que cada B es independientemente adenina, guanina, citosina, timina, uridina, diaminopurina, con la condición de que al menos un B sea una base modificada representada por la fórmula:



(Fórmula I),

- 20 en la que Z es O; y en la que X¹ y X², tomados juntos, son α,α-dimetil-o-bencileno:



Los oligómeros polinucleotídicos modificados de la presente invención comprenden o consisten habitualmente en un polinucleótido monocatenario que tiene algo menos de 100 nucleótidos, aunque también se contemplan secuencias más largas de centenares o miles o más bases.

- 5 En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende algo menos de 30 nucleótidos, preferiblemente, el oligómero oligonucleotídico comprende de alrededor de 9 a alrededor de 25 nucleótidos, es decir, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

10 En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende, o consiste en, de 2 a alrededor de 100, de 2 a alrededor de 50, de 2 a alrededor de 25, de 2 a alrededor de 15, de 5 a alrededor de 50, de 5 a alrededor de 25, de 5 a alrededor de 15, de alrededor de 10 a alrededor de 50, de alrededor de 10 a alrededor de 25, de alrededor de 10 a alrededor de 20, de alrededor de 10 a alrededor de 15, de alrededor de 12 a alrededor de 50, de alrededor de 12 a alrededor de 25, o de alrededor de 12 a alrededor de 20 nucleótidos. Los oligómeros se pueden citar mediante su longitud. Por ejemplo, un oligómero de 15 nucleótidos se puede citar como un "15-mero".

15 Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la posición dentro de un oligómero polinucleotídico modificado, sonda, cebador o PNA, en los que se puede incorporar una base de timina modificada, no está limitada. Se describen aquí oligómeros polinucleotídicos, sondas, cebadores y PNAs en los que una base de timina modificada se incorpora en diversas posiciones. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 1 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 2 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase Pf1-T-1, Pf1-T-4, Pf1-T-5, Pf1-T-7, Pf1-T-8; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 3 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 4 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase P1-1R, PNA-T1, PNA-T3; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 5 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 6 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase Pf1-T-2, Pf1-T-4, Pf1-T-5, Pf1-T-8; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 7 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase PNA-T2, PNA-T3; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de citosina modificada está en la posición 8 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase T1, T1-2, O4; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 9 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase O4, P1R; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 10 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 11 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase O4, Pf1-T-3, Pf1-T-5; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 12 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase T2, T1-2, O4, Pf1-T-6, Pf1-T-7, Pf1-T-8; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 13 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 14 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 15 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 16 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase Pf1-T-6, Pf1-7-7, Pf1-T-8, Sonda; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 17 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 18 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase Pf1-T-6, Pf1-T-7, Pf1-T-8, Sonda; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 19 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3'. En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 20 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase P1F; Tabla 3). En algunas realizaciones, una base de timina modificada está en la posición 21 de un polinucleótido cuando se escribe en una dirección 5'→3' (por ejemplo, véase Pf1-T-6, Pf1-T-7, Pf1-T-8; Tabla 3).

50 Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, el número de bases de timina modificadas dentro de un oligómero polinucleotídico, sonda o cebador, no está limitado. Se describen aquí oligómeros polinucleotídicos, sondas, cebadores y PNAs que comprenden diversos números de bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende una base de timina modificada (por ejemplo, véase T1, T2, Pf1-T-1, Pf1-T-2, Pf1-T-3, P1F, P1R, P1-1R, PNA-T1, PNA-T2; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende dos bases de timina modificadas (por ejemplo, véase T1-2, Pf1-T-4, Sonda, PNA-T3; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero

polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende tres bases de timina modificadas (por ejemplo, véase Pf1-T-5; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende cuatro bases de timina modificadas (por ejemplo, véase O4, Pf1-T-6; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende cinco bases de timina modificadas (por ejemplo, véase Pf1-T-7; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende seis bases de timina modificadas (por ejemplo, véase Pf1-T-8; Tabla 3). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos una base de timina modificada. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos dos bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos tres bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos cuatro bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos cinco bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos seis bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos siete bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos diez bases de timina modificadas. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos veinte bases de timina modificadas.

En algunas realizaciones, en las que un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos dos bases de timina modificadas, las bases de timina modificadas están próximas entre sí (por ejemplo, véase O4; Tabla 3). En algunas realizaciones, en las que un oligómero polinucleotídico, cebador, sonda o PNA comprende al menos dos bases de timina modificadas, las bases de timina modificadas están separadas entre sí por una o más bases de origen natural.

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención está unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención está unido a una perla. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención está unido a una matriz. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención está unido a una micromatriz.

1. Oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden otras modificaciones

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados de la invención que comprenden una o más bases modificadas comprenderán además otros tipos de modificaciones, de manera que comprenden bases modificadas o análogos de bases, y/o marcadores detectables, inhibidores de la fluorescencia y/o de la quimioluminiscencia, y/o ligantes del surco menor, y/o una o más modificaciones de bases, modificaciones de azúcar y/o modificaciones de la cadena principal.

Mientras que en los párrafos siguientes se describen individualmente por claridad modificaciones adicionales de un oligómero polinucleotídico modificado, alguien de pericia normal en la técnica apreciará que cada una de las modificaciones descritas individualmente se puede combinar con otra. Por ejemplo, un oligómero polinucleotídico modificado adicional comprende una modificación de azúcar y una modificación de cadena principal. En otro ejemplo no limitante, un oligómero polinucleotídico modificado adicional comprende una modificación de azúcar y un marcador. En un ejemplo adicional, un oligómero polinucleotídico modificado adicional comprende una modificación de cadena principal y un marcador. En todavía otro ejemplo no limitante, un oligómero polinucleotídico modificado adicional comprende un marcador y una modificación de base.

(a) Oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden modificaciones de azúcar

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados descritos aquí comprenden uno o más restos de azúcar modificados. Se puede usar una variedad de restos de azúcar para modificar un polinucleótido modificado de la presente invención. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la localización de una modificación de azúcar dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí. En algunas realizaciones, un resto de azúcar para modificar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención incluye, pero no se limita a, arabinosa, d-arabino-hexitol, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa. En algunas realizaciones, un resto de azúcar para modificar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en arabinosa, d-arabino-hexitol, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención incluye uno o más nucleótidos que tienen unido un resto de azúcar modificado. Se puede usar una variedad de restos de azúcar para unirlos a un nucleótido que se incorporará en un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención. En algunas realizaciones, un resto de azúcar unido a un nucleótido incluye un azúcar 2'-sustituido, tal como un azúcar de 2'-O-alkil-ribosa, un azúcar de 2'-amino-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-arabinosa, o un azúcar de 2'-O-metoxietil-ribosa (2' MOE). En algunas realizaciones, un resto de azúcar unido a un nucleótido se selecciona del grupo que consiste en un azúcar 2'-sustituido, tal como un azúcar de 2'-O-alkil-ribosa, un azúcar de 2'-amino-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-arabinosa,

y un azúcar de 2'-O-metoxietil-ribose (2' MOE). En una realización particular de la presente invención, el resto de azúcar unido al nucleótido es un azúcar de 2'-O-metoxietil-ribose (2' MOE).

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un azúcar de ácido nucleico bloqueado ("LNA"). Un azúcar de LNA es un azúcar bicíclico, es decir, que contiene un puente metilénico entre C-4' y un átomo de oxígeno en C-2'. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende uno o más nucleótidos que tienen un azúcar de LNA. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado contiene una o más regiones que consisten en nucleótidos con restos de azúcar de LNA. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado contiene nucleótidos con restos de azúcar de LNA intercalados con desoxirribonucleótidos. Véase, por ejemplo, Frieden, M. et al. (2008) Curr. Pharm. Des. 14(11):1138-1142.

10 (b) Oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden modificaciones de cadena principal

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende una modificación de la cadena principal. Se pueden introducir diversas modificaciones de cadena principal en un oligonucleótido modificado. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la localización de una modificación de cadena principal en un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí.

15 En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende uno o más enlaces de fosfodiéster. En algunas realizaciones, los análogos nucleotídicos incluyen modificaciones de cadena principal tales como el uso de un ácido nucleico peptídico (PNA). En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un enlace modificado, tal como un enlace de fosfotriéster, un fosforamidoato, un siloxano, un carboximetiléster, un acetamidoato, un carbamato, un tioéster, un fosforamidoato en puente, un metilfosfonato en puente, un fosforotioato, un metilfosfonato, un éster de fosfato, un alquilfosfonato, un fosforoditioato, un carbonato, un triéster de fosfato, un éster carboximetílico, un metilfosforotioato, un fosforoditioato, un p-etoxi, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un enlace modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosfotriéster, un fosforamidoato, un siloxano, un carboximetiléster, un acetamidoato, un carbamato, un tioéster, un fosforamidoato en puente, un metilfosfonato en puente, un fosforotioato, un metilfosfonato, un alquilfosfonato, un éster de fosfato, un alquilfosfonato, un fosforoditioato, un carbonato, un triéster de fosfato, un éster carboximetílico, un metilfosforotioato, un fosforoditioato, un p-etoxi, y combinaciones de los mismos.

25 Por ejemplo, los PNAs se pueden sintetizar fácilmente para que contengan bases de ADN convencionales (A, C, T y G) o bases no convencionales, pero las unidades monoméricas de PNA están enlazadas mediante una cadena principal de poliamida en lugar de una cadena principal de fosfato de azúcar.

30 (c) Oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden modificaciones de bases

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende una o más bases no estándar (es decir, distintas de adenina, guanina, timina, citosina y uracilo). En un oligonucleótido modificado se pueden introducir diversas bases no estándar. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la localización de una modificación de base en un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí. Tales bases no estándar pueden servir para un número de fines, por ejemplo para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para promover o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos inhibidores. Numerosos ejemplos de bases modificadas (distintas de las bases modificadas de la presente descripción) y análogos de bases se señalan anteriormente, son conocidos en la técnica, y se pueden usar para modificar adicionalmente un oligómero polinucleotídico modificado.

En algunas realizaciones, un oligómero modificado comprende una base modificada que es un nucleótido modificado con amina, es decir, un nucleótido que se ha modificado para que contenga un grupo amina reactivo.

Los oligómeros polinucleotídicos modificados de la presente invención pueden comprender cualquier combinación de bases normales o modificadas, tales como bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (por ejemplo PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purinas modificadas, pirimidinas modificadas, pirimidinas 5-sustituidas, o bases universales, por ejemplo.

(d) Oligómeros oligonucleotídicos modificados que comprenden un marcador

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un marcador, preferiblemente un marcador detectable. Un oligómero polinucleotídico modificado que comprende un marcador detectable se usa como una sonda o como un cebador, por ejemplo, como se describe aquí. En el oligonucleótido modificado se pueden introducir diversos marcadores. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la localización de un marcador dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí.

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un fluoróforo en un extremo de su secuencia, y/o un inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo de su secuencia, de manera que el inhibidor de la fluorescencia suprime la señal de fluorescencia del fluoróforo en la sonda intacta (es decir, el oligómero

polinucleotídico modificado se está usando como una sonda) vía un mecanismo de transferencia de energía, tal como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"). Cuando una polimerasa extiende un cebador a lo largo de un molde al que también se ha hibridado la sonda, la actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la sonda (es decir, el oligómero polinucleotídico modificado), permitiendo de ese modo que el fluoróforo se difunda del inhibidor de la fluorescencia, de manera que ahora se detecta la señal fluorescente. La señal aumenta con cada ciclo de PCR proporcionalmente a la cantidad de sonda que se escinde, y de este modo, proporcionalmente a la cantidad de producto de amplificación (amplicón, secuencia diana). Esto permite la detección y cuantificación directas de la secuencia de ADN diana. En algunas realizaciones, un fluoróforo está unido a una base que está al menos una posición nucleotídica alejada del extremo de la secuencia del oligómero polinucleotídico modificado, y/o el inhibidor de la fluorescencia está unido a una base que está en al menos una posición nucleotídica alejada del otro extremo del oligómero polinucleotídico modificado. En algunas realizaciones, el fluoróforo y/o el inhibidor de la fluorescencia están situados internamente dentro de un oligómero polinucleotídico modificado. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la localización del fluoróforo y/o del inhibidor de la fluorescencia dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada.

En algunas realizaciones, el fluoróforo y el inhibidor de la fluorescencia no están en los extremos de una sonda de FRET. En algunas realizaciones, el espectro de emisión del fluoróforo solapa considerablemente con el espectro de absorción del inhibidor de la fluorescencia. Sin embargo, tal solapamiento espectral es menos importante, o no se requiere, cuando la inhibición de la fluorescencia implica un mecanismo de colisión, o el solapamiento se incrementa debido a condiciones de reacción o a la estructura de la sonda, por ejemplo.

En algunas realizaciones, los marcadores que se usan en sondas de FRET (es decir, en oligómeros polinucleotídicos modificados que se usan como sondas de FRET) incluyen sustancias colorimétricas y colorantes o fluoróforos tales como colorantes Alexa Fluor, colorantes BODIPY, tal como BODIPY FL; Cascade Blue; Cascade Yellow; cumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metilcumarina, aminocumarina e hidroxycumarina; colorantes de cianina, tales como Cy3 y Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tal como isotiocianato de fluoresceína; quelatos macrocíclicos de iones lantánidos, tal como Quantum Dye(TM); Marina Blue; Oregon Green; colorantes de rodamina, tal como rojo de rodamina, tetrametilrodamina y rodamina 6G; Rojo Texas; colorantes de transferencia de energía fluorescente, tal como el heterodímero de naranja de tiazol-etidio; y TOTAB.

Los ejemplos específicos de colorantes útiles que se pueden usar para modificar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los identificados anteriormente, y los siguientes: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, and, Alexa Fluor 750; colorantes BODIPY reactivos con amina, tales como BODIPY 493/503, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, y, BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, verde de rodamina, rojo de rodamina, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, 2', 4', 5', 7' tetrabromosulfona-fluoresceína, TET, y Rojo Texas.

Los ejemplos de pares de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia (es decir, pares de dador/aceptor) que se pueden usar para modificar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína/tetrametilrodamina; IAEDANS/fluoresceína; EDANS/dabcilo; fluoresceína/fluoresceína; BODIPY FL/BODIPY FL; fluoresceína/QSY 7, o fluoresceína/QSY 9. Cuando el dador y el aceptor son los mismos, FRET se puede detectar, en algunas realizaciones, mediante despolarización de la fluorescencia. Ciertos ejemplos específicos de pares de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia (es decir, pares de dador/aceptor) incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor 350/Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 555; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 568/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 594/ Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 350/QSY35; Alexa Fluor 350/dabcilo; Alexa Fluor 488/QSY 35; Alexa Fluor 488/dabcilo; Alexa Fluor 488/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 555/QSY 7 o QSY9; Alexa Fluor 568/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 568/QSY 21; Alexa Fluor 594/QSY 21; y Alexa Fluor 647/QSY 21. En algunas realizaciones, el mismo inhibidor de la fluorescencia se puede usar para múltiples fluoróforos, por ejemplo un inhibidor de amplio espectro, tal como un inhibidor Iowa Black(R) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) o un Black Hole Quencher(TM) o (BHQ(TM)); Biosearch Technologies, Petaluma, CA). De este modo, en algunas realizaciones de la presente invención, un oligómero polinucleotídico modificado comprende un par fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia seleccionado del grupo que consiste en fluoresceína/tetrametilrodamina; IAEDANS/fluoresceína; EDANS/dabcilo; fluoresceína/fluoresceína; BODIPY FL/BODIPY FL; fluoresceína/QSY 7 fluoresceína/QSY 9, Alexa Fluor 350/Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 555; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 546/ Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 546/ Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 568/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 594/ Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 350/QSY35; Alexa Fluor 350/dabcilo; Alexa Fluor 488/QSY 35; Alexa Fluor 488/dabcilo; Alexa Fluor 488/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 555/QSY 7 o QSY9; Alexa Fluor 568/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 568/QSY 21; Alexa Fluor 594/QSY 21; y Alexa Fluor 647/QSY 21.

En algunas realizaciones, por ejemplo en una reacción múltiplex en la que se detectan simultáneamente dos o más restos, cada sonda de oligómero polinucleotídico modificado puede comprender un fluoróforo detectablemente diferente, de manera que los fluoróforos se pueden distinguir cuando se detectan simultáneamente en la misma reacción. Un experto en la técnica puede seleccionar un conjunto de fluoróforos detectablemente diferentes para uso en una reacción múltiplex a partir de los pares de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia descritos anteriormente, u otros conocidos en la técnica. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la elección de un fluoróforo y/o inhibidor de la fluorescencia, y la localización del fluoróforo y/o inhibidor de la fluorescencia dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención, pueden variar, y no están limitadas a la descripción aquí.

10 (e) Oligómeros oligonucleotídicos modificados que comprenden otras modificaciones

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado descrito aquí comprende además uno o más grupos colgantes. Se puede usar una variedad de grupos colgantes para modificar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la elección de un grupo colgante y la localización del grupo colgante dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención pueden variar, y no están limitadas a la descripción aquí. Un grupo colgante puede ser un resto, tal como un grupo lipófilo, un ligando de unión al surco menor, un intercalador, un agente quelante o un agente de reticulación, unido a una o más bases situadas internamente, a un término 3', a un término 5', a ambos términos, o internamente y en uno o ambos términos de un oligómero polinucleotídico modificado. De este modo, en algunas realizaciones, un grupo colgante unido a un oligómero polinucleotídico modificado es un resto seleccionado del grupo que consiste en un grupo lipófilo, un ligando de unión al surco menor, un intercalador, un agente quelante, y un agente de reticulación. Los métodos adecuados para unir tales grupos colgantes son conocidos generalmente en la técnica.

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención comprende un "resto de cola" de bajo peso molecular. Para modificar adicionalmente un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención, se puede usar una variedad de "restos de cola". Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la elección de un "resto de cola" y la localización del "resto de cola" dentro de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención pueden variar, y no se limitan a la descripción aquí. En algunas realizaciones, un resto de cola se une al extremo 3' o al extremo 5', o a ambos extremos, de un oligómero polinucleotídico modificado. Una molécula de cola puede ser un fosfato, un éster de fosfato, un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, o un grupo lipófilo. De este modo, en algunas realizaciones, un resto de cola unido a un oligómero polinucleotídico modificado se selecciona del grupo que consiste en un fosfato, un éster de fosfato, un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, y un grupo lipófilo. En algunas realizaciones, un resto de cola enlaza un intercalador, un grupo lipófilo, un ligando de unión al surco menor (MGB), un grupo informador, un agente quelante o una funcionalidad de reticulación, a un oligómero polinucleotídico modificado. Por ejemplo, un MGB se puede unir a un extremo cualquiera o a ambos extremos del oligómero oligonucleotídico modificado. Además, o como alternativa, uno o más MGBs se pueden unir en una localización interior dentro del oligómero oligonucleotídico modificado. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, tal elección puede depender de la longitud del oligómero oligonucleotídico modificado.

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado comprende proporciones no naturales de un isótopo atómico. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado está radiomarcado. Los radiomarcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), fósforo (^{32}P) o carbono-14 (^{14}C).

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado se proporciona en forma de sal. Los oligómeros polinucleotídicos modificados se pueden proporcionar en diversas formas salinas. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la forma de sal de un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí. Las formas salinas de oligómeros polinucleotídicos modificados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de bases, tales como sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar.

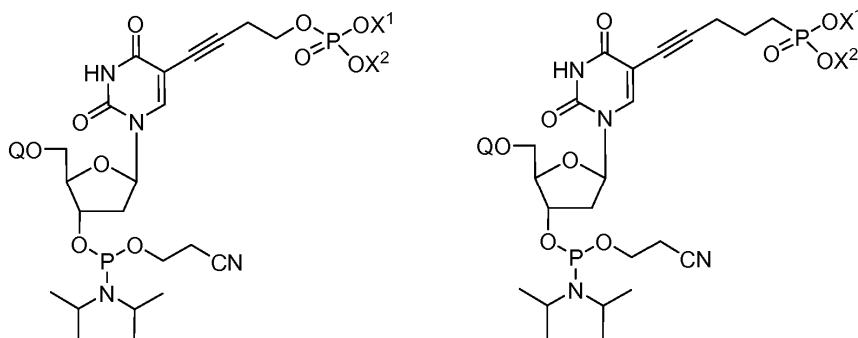
En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados descritos aquí comprenden funcionalidades básicas y/o ácidas. El estado de la carga de cualquier grupo ionizable dependerá del pH del entorno. Por ejemplo, los átomos de oxígeno que no forman puentes de un grupo fosfato en un oligómero polinucleotídico modificado tenderán a estar más protonados en condiciones de pH ácido que en condiciones de pH básico. De este modo, aunque se pueden mostrar estructuras con un estado de protonación particular (por ejemplo, un resto diácido de fosfato totalmente protonado), el estado real de protonación de los grupos ionizables en los oligómeros polinucleotídicos modificados dependerá de factores tales como el pH, el contenido de agua, y la concentración de sal del disolvente.

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados poseen átomos de carbono asimétricos o dobles enlaces, por ejemplo se proporcionan como racematos, diastereómeros, isómeros geométricos, e isómeros individuales, todos los cuales están destinados a estar englobados dentro del alcance de la invención. Por ejemplo,

aunque el ADN y ARN convencionales comprenden D-estereoisómeros de subunidades nucleotídicas, también están englobados por la presente descripción los L-estereoisómeros de ADN y ARN.

C. Fosforamiditos nucleosídicos modificados

5 La presente invención también proporciona fosforamiditos nucleosídicos modificados representados por las fórmulas:



fosforamidito de T^{BP}

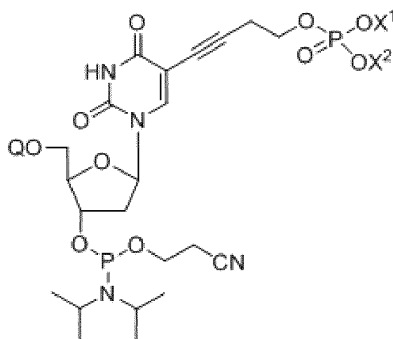
fosforamidito de T^{PP},

en las que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores de fosfato o de fosfonato que son iguales o diferentes, o

10 en las que X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector de fosfato o fosfonato bidentado; y

en las que Q es un grupo protector de hidroxilo.

En una realización particular de la presente invención, un fosforamidito nucleosídico modificado se representa mediante la fórmula:

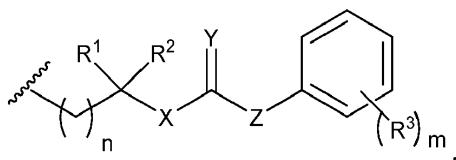


15 fosforamidito de T^{BP},

en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores de fosfato o de fosfonato que son iguales o diferentes, o en la que X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector de fosfato o fosfonato bidentado; y en la que Q es un grupo protector de hidroxilo.

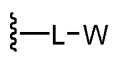
20 En las fórmulas anteriores, preferiblemente, Q es eliminable en condiciones ácidas. En algunas realizaciones, Q es tritilo, metoxitritilo (MMT), o dimetoxitritilo (DMT). En algunas realizaciones, X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado tal como o-bencileno, α-metil-o-bencileno, o α,α-dimetil-o-bencileno.

En algunas realizaciones de los fosforamiditos nucleosídicos modificados, cuando los grupos protectores X¹ y X² se toman separadamente, cada uno puede tener una estructura representada por la fórmula:

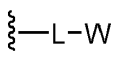


5 en la que R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₆, alqueno de C₂-C₆, alquino de C₂-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, o fenilo; n y m son independientemente 0, 1, 2, 3 o 4; X es O o NR⁴; Y es O o S; Z es un enlace, O o NR⁴; cada R³ es igual o diferente, y es, independientemente, alquilo de C₁-C₆, alqueno de C₂-C₆, alquino de C₂-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, ciano, nitro, halógeno, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₆-oxi, NR^{5a}R^{5b}, o fenilo; R⁴, R^{5a} y R^{5b} son, cada uno independientemente, cicloalquilo de C₃-C₆, o fenilo. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2000/055179 A1).

En algunas realizaciones de los fosforamiditos nucleosídicos modificados, R¹ y R² tienen independientemente la estructura:



10 en la que L es un enlace, alqueno de C₁-C₈ o heteroalqueno de C₂-C₈, alqueno de C₂-C₈; y W es H, ciano, C(O)NR^aR^b, NO₂, N⁺R^aR^b, R^c, C₆H₄NO₂, C₆H₄Cl, C₆H₃(NO₂)₂, C₆H₂(NO₂)₃, SO₂R^c, o S(O)₂OR^c; R^a y R^b son, independientemente, H, CF₃, alquilo de C₁-C₈ o arilo de C₆-C₁₀; y R^c es alquilo de C₁-C₈ o arilo de C₆-C₁₀. Tales grupos son ventajosos puesto que se pueden eliminar mediante tratamiento convencional con amoníaco o hidróxido de amonio. En una realización particular de la presente invención, el fosforamidito nucleosídico modificado según la
15 fórmula anterior es un fosforamidito nucleosídico modificado en el que X¹ y X² tienen independientemente la estructura:



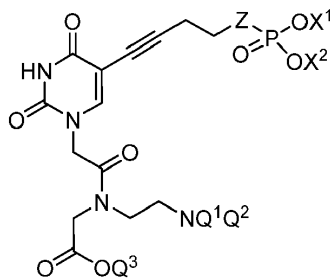
en la que L es un enlace, y W es H.

En algunas realizaciones, X¹ y X² son cada uno, separadamente, grupos pivaloiloxibencilo.

20 Los fosforamiditos nucleosídicos modificados de la presente invención son de origen no natural. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, los fosforamiditos nucleosídicos modificados son útiles para sintetizar oligómeros polinucleotídicos modificados de la invención.

D. Monómeros de PNA modificados

25 La presente invención también proporciona monómeros de PNA modificados protegidos, representados mediante la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O;

en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores que son iguales o diferentes, o en la que X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado;

30 en la que Q¹ y Q² son independientemente H o un grupo protector de nitrógeno, o en la que Q¹ y Q², juntos, son un grupo protector de nitrógeno; y

en la que Q³ es H o un grupo protector de carboxilo.

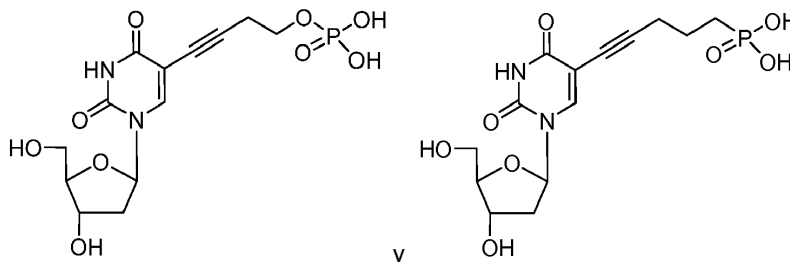
35 En algunas realizaciones de un monómero de PNA modificado, Z es O. En algunas realizaciones, Z es CH₂. En una realización particular de la presente invención, un monómero de PNA modificado protegido, según la fórmula anterior, es un monómero de PNA modificado protegido en el que Z es O.

En algunas realizaciones, Q¹ es H, y Q² es Fmoc. En algunas realizaciones, Q³ es H. En algunas realizaciones, X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado, tal como o-bencileno, α-metil-o-bencileno, o α,α-dimetil-o-bencileno. Preferiblemente, siempre que X¹, X², o ambos, sean un grupo protector, o sean grupos protectores, el grupo o grupos protectores son eliminables mediante tratamiento con amoníaco.

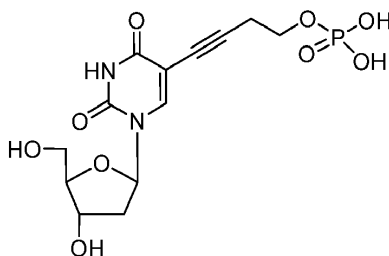
40 Los monómeros de PNA modificados de la presente invención son de origen no natural.

E. Nucleósidos modificados y nucleótidos modificados

La presente invención también proporciona nucleósidos modificados representados mediante las fórmulas:



En una realización particular de la presente invención, un nucleósido modificado se representa mediante la fórmula:

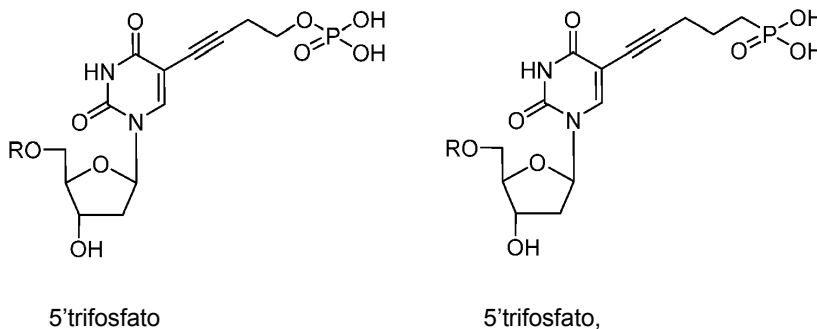


5

Los nucleósidos modificados de la presente invención son de origen no natural. Son útiles, por ejemplo, como sustratos en cualquier reacción, ya sea química o enzimática, para la cual el nucleósido de ADN y ARN convencional timidina es el sustrato. Por ejemplo, los nucleósidos se pueden convertir en mono-, di-, y trifosfatos mediante las enzimas cinasas apropiadas. En el Ejemplo 13, por ejemplo, se proporcionan procedimientos generales para obtener tales nucleósidos de timidina modificados.

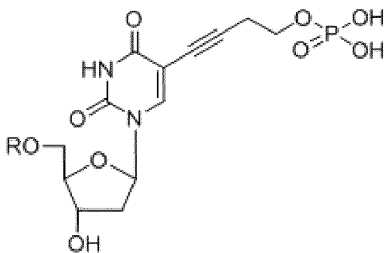
10

La presente invención también proporciona nucleótidos modificados, representados por las fórmulas:



en las que $R = (HO)_2(O=)P-O-[(HO)(O=)P]-O-[(HO)(O=)P]-$.

15 En una realización particular de la presente invención, un nucleótido modificado se representa mediante la fórmula:



en la que

$R = (HO)_2(O=)P-O-[(HO)(O=)P]-O-[(HO)(O=)P]-$.

20 En el Ejemplo 14, por ejemplo, se proporcionan procedimientos generales para obtener tales 5'-trifosfatos de nucleótido de timina modificados. Los nucleótidos modificados de la invención también se pueden introducir en

oligómeros polinucleotídicos usando nucleotidil transferasa, de la misma manera que los nucleótidos convencionales, y tales producen un oligómero polinucleotídico modificado.

Los nucleótidos modificados de la presente invención son de origen no natural. Tales nucleótidos se pueden usar en lugar de los ésteres de fosfato de timidina convencionales correspondientes en una reacción enzimática o sintética en la que es deseable usar una base modificada de la presente descripción. Por ejemplo, un 5'-trifosfato de nucleótido, que comprende una base modificada de la presente descripción, se puede incorporar en un oligómero polinucleotídico modificado mediante ADN polimerasas. Esto se puede hacer, por ejemplo, para potenciar la afinidad de hibridación del producto o productos de extensión del cebador resultantes. En un ejemplo no limitante, esto se hace como sigue: (a) proporcionar una mezcla que comprende una ADN polimerasa dependiente del molde, un 5'-trifosfato de nucleótido de la invención, y opcionalmente uno o más trifosfatos de dideoxinucleótido, tales como dATP, dCTP, dGTP, y/o TTP convencional) y otros componentes amortiguadores, tales como iones Mg^{2+} y/o Mn^{2+} ; y (b) aparear un cebador a una secuencia complementaria en una hebra molde de ADN o de ARN, de manera que una polimerasa puede incorporar una base modificada (es decir, un nucleótido modificado), y otros NTPs si están presentes, en un cebador extendido, formando de ese modo un oligómero polinucleotídico que comprende una base modificada de la presente descripción. Véase también Kutayin, I., *Biochemistry* 47:13666-13673 (2008), "Use of Base-Modified Duplex-Stabilizing Deoxynucleoside 5'-Triphosphates to Enhance the Hybridization Properties of Primers and Probes in Detection Polymerase Chain Reaction", para condiciones de reacción adecuadas para la extensión de cebadores.

F. Dúplex

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un dúplex que comprende un oligómero polinucleotídico modificado y una secuencia polinucleotídica. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un dúplex que comprende una pluralidad de oligómeros polinucleotídicos modificados y una secuencia polinucleotídica. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un dúplex que comprende al menos un oligómero polinucleotídico modificado y una secuencia polinucleotídica. Aunque el oligómero polinucleotídico modificado dentro de tal dúplex es un oligómero de origen no natural, en algunas realizaciones la secuencia polinucleotídica en el dúplex es una secuencia polinucleotídica de origen natural. En algunas realizaciones, tanto el polinucleótido modificado como la secuencia polinucleotídica son de origen no natural. En algunas realizaciones del dúplex de la presente invención, el al menos un oligómero polinucleotídico modificado comprende cuatro o más bases contiguas que son complementarias y se hibridan a al menos cuatro bases contiguas de la secuencia polinucleotídica.

Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, cualquier oligómero polinucleotídico modificado descrito aquí y cualquier polinucleótido modificado que comprenda cualquier modificación adicional como se describe aquí se pueden usar para formar un dúplex con una secuencia polinucleotídica. También, la secuencia polinucleotídica es no limitante. Se puede usar cualquier polinucleótido que tenga al menos cuatro o más nucleótidos contiguos de complementariedad a un polinucleótido modificado.

En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia nucleotídica procariota. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia nucleotídica eucariota. En alguna realización, la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia nucleotídica vírica.

En algunas realizaciones de un dúplex, la secuencia polinucleotídica es más larga que el oligómero polinucleotídico modificado, es decir, la secuencia polinucleotídica comprende más nucleótidos que el oligómero polinucleotídico modificado.

En algunas realizaciones, el dúplex está unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, un dúplex de la presente invención está unido a una perla. En algunas realizaciones, un dúplex de la presente invención está unido a una matriz. En algunas realizaciones, un dúplex de la presente invención está unido a una micromatriz.

III. Métodos

A. Sintetizando polinucleótidos modificados, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados, y otros restos que comprenden una base de timina modificada

Los oligómeros, nucleósidos, nucleótidos, y otros restos que contienen una base de timina modificada de la presente descripción se pueden sintetizar mediante cualquier método adecuado, y se sintetizan típicamente de manera química y/o enzimática. Se describen aquí métodos preferidos, por ejemplo véanse los Ejemplos 1-12.

Por ejemplo, los oligómeros polinucleotídicos modificados se pueden sintetizar en el laboratorio mediante síntesis en fase sólida usando un método de fosforamidito y bloques de construcción de fosforamidito derivados de 2'-desoxinucleósidos (dA, dC, dG, y dT) adecuadamente protegidos, ribonucleósidos (A, C, G, y U), o nucleósidos químicamente modificados, por ejemplo LNA, BNA, etc. El ensamblaje de la cadena polinucleotídica transcurre en la dirección desde el término 3' al 5' siguiendo un procedimiento habitual denominado como un "ciclo sintético". La terminación de un único ciclo sintético da como resultado la adición de un resto nucleotídico a la cadena creciente. Para aislar oligómeros polinucleotídicos modificados que tienen una secuencia deseada, se usan HPLC y otros métodos conocidos en la técnica.

Los métodos para sintetizar polinucleótidos y sus análogos se han descrito en numerosas publicaciones, son bien conocidos, y se pueden usar, además de los métodos descritos en los Ejemplos 1-12, para sintetizar los restos modificados de la presente descripción. Véanse, por ejemplo, Gait, *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (1990), y S. Agrawal, *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, *Methods in Molecular Biology* Vol. 20, Humana Press, Totowa, N.J. (1993). Para la síntesis de oligómeros de PNA modificados, se pueden usar métodos de síntesis peptídica convencionales, como se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Nielsen et al., *Science* 254:1497-1500 (1991)). También se pueden usar métodos enzimáticos, tal como extensión de cebador mediada mediante ADN polimerasas, o la fosforilación de un nucleósido en la posición 5' usando una cinasa apropiada.

En los Ejemplos 5 a 12 aquí, se ilustran adicionalmente diversas propiedades de los oligómeros polinucleotídicos de la invención.

Los Ejemplos 9 a 12 aquí describen la síntesis y caracterización de varios oligómeros de PNA ejemplares según la invención.

B. Utilidades ejemplares de polinucleótidos modificados, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados, y otros restos que comprenden una base de timina modificada

Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica al leer esta descripción, las bases modificadas, y los oligómeros polinucleotídicos modificados, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados, y otros restos modificados que los contienen y que se describen aquí, encuentran diversos usos en el campo de procesamiento y manipulación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, son útiles para potenciar la estabilidad de los dúplex, por ejemplo en complejos de hibridación, tales como dúplex y tríplex polinucleotídicos. En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados se usan como sondas moleculares, por ejemplo en secuenciación de ADN, construcción de bibliotecas, matrices, transferencias Southern, análisis ASO, hibridación fluorescente in situ (FISH), síntesis de genes artificiales, como cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y similares, en ensayos de ligación (por ejemplo, para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido conocidos), etc. Los métodos enunciados anteriormente son conocidos en la técnica. Alguien de pericia normal en la técnica no tendrá ninguna dificultad sustituyendo, por ejemplo, una base de origen natural, un nucleósido de origen natural, un nucleótido de origen natural o un oligómero polinucleotídico de origen natural, usados en cualquiera de esos métodos, por una base de timina modificada de origen no natural como se describe aquí, por un nucleósido de origen no natural como se describe aquí, por un nucleótido modificado de origen no natural, o por un oligómero polinucleotídico modificado de origen no natural, como se describe aquí.

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados de la presente invención comprenden una o más bases de timina modificadas que mejoran la eficiencia de las reacciones de extensión de cebadores. La estabilidad añadida del dúplex proporcionada por las bases de timina modificadas de la presente descripción permite al experto llevar a cabo la extensión de cebadores a mayores temperaturas que con oligómeros polinucleotídicos de origen natural que carecen de tales bases de timina modificadas. De ese modo, se pueden reducir los tiempos de extensión de los cebadores y/o los tiempos de la rampa de transición entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de hibridación. Mayores temperaturas de reacción también son ventajosas para minimizar estructuras secundarias potencialmente problemáticas en moléculas diana, y pueden reducir la formación de dímeros de cebadores. Además, sin estar atados por la teoría, se cree que el uso de mayores temperaturas de reacción también reduce el ruido.

Lo siguiente describe algunos usos no limitantes de las bases de timina modificadas de origen no natural, de los nucleósidos modificados de origen no natural, de los nucleótidos modificados de origen no natural y de los oligómeros polinucleotídicos modificados de origen no natural como se describen aquí.

1. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados en aplicaciones de matriz

En algunas realizaciones, los oligómeros polinucleotídicos modificados se usan en aplicaciones que comprenden una matriz. Un experto en la técnica conoce numerosas aplicaciones que implican una matriz. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, la elección de una aplicación que implica una matriz a la que se une un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención puede variar, y no está limitada a la descripción aquí. En algunas realizaciones, una aplicación de matriz es, por ejemplo, para análisis de la expresión de genes a base de matrices o para hibridación. Las matrices no limitantes ejemplares incluyen matrices de chip o de plataforma, matrices de perlas, matrices de fase líquida, matrices de "códigos postales", y similares. La estabilidad superior de los oligómeros polinucleotídicos modificados en el emparejamiento de bases con secuencias nucleotídicas diana da como resultado una discriminación mejorada de las secuencias relacionadas, en particular al nivel de un solo nucleótido, lo que es ventajoso en análisis a base de matrices o de hibridación. Los materiales adecuados para la construcción de matrices, tales como nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio, fibras ópticas, etc., son conocidos por aquellos de pericia en la técnica.

2. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados como sondas

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado es una sonda. En algunas realizaciones, la sonda comprende un marcador o resto detectable. Un marcador detectable, como se usa aquí, incluye tanto restos

directamente detectables, tales como colorantes fluorescentes (fluoróforos), como restos indirectamente detectables, tales como miembros de pares de unión. Cuando el resto detectable es un miembro de un par de unión, en algunas realizaciones la sonda puede ser detectable incubando la sonda con un marcador detectable unido al segundo miembro del par de unión. En algunas realizaciones, una sonda no está marcada, tal como cuando una sonda es una sonda de captura, por ejemplo en una micromatriz o perla. En algunas realizaciones, una sonda no es extensible, por ejemplo mediante una polimerasa. En algunas realizaciones, una sonda es extensible.

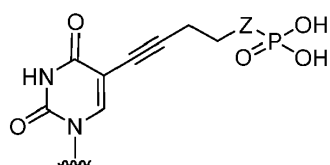
En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado es una sonda de FRET. Una sonda de FRET puede estar marcada en el extremo 5' con un colorante fluorescente y en el extremo 3' con un inhibidor de la fluorescencia, un grupo químico que absorbe (es decir, suprime) la emisión de fluorescencia del colorante cuando los grupos están muy próximos entre sí (es decir, unidos a la misma sonda).

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado es una sonda de PCR de 5' nucleasa, una sonda Molecular Beacon™, o una sonda Scorpion™.

3. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados en métodos de hibridación

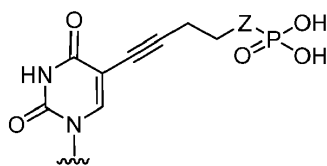
La hibridación de oligómeros y ácidos nucleicos a oligómeros polinucleotídicos modificados complementarios es útil en una variedad de aplicaciones, como entenderá una persona de pericia normal en la técnica. Por ejemplo, la formación de un dúplex hibridado que comprende un oligómero polinucleotídico modificado de la invención se puede detectar directamente como el resultado de un cambio en una señal detectable o característica del dúplex, como en técnicas de hibridación de fluorescencia in situ (FISH), por ejemplo. De este modo, un oligómero polinucleotídico modificado de la invención se puede proporcionar como una sonda no marcada o marcada, para facilitar tal detección. El dúplex también se puede someter a una separación en fase sólida o electroforética, por ejemplo, para distinguir la señal verdadera del fondo. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado hibridado se altera químicamente en cierto modo como resultado de la hibridación a una secuencia diana complementaria. Por ejemplo, en un proceso de extensión de cebador, tal como PCR, un oligómero polinucleotídico modificado se puede denominar como un "cebador modificado". Tal cebador modificado se puede extender para formar un producto de extensión de cebador que puede servir como molde para el siguiente ciclo de PCR. En una reacción de 5'-nucleasa, un oligómero polinucleotídico modificado se puede denominar como una "sonda oligomérica modificada". Tal sonda oligomérica modificada se puede escindir mediante una actividad de exonucleasa de una ADN polimerasa, tal como Taq polimerasa, para producir fragmentos escindidos que se pueden detectar mediante fluorescencia u otros medios. En tales aplicaciones, la extensión de un cebador o la escisión de una sonda es signo de que un oligómero polinucleotídico modificado de la invención formó un dúplex mediante hibridación con una secuencia de ácido nucleico complementaria. Además, las condiciones de reacción se pueden ajustar para determinar las condiciones más adecuadas para maximizar la hibridación para una aplicación particular. En particular, las temperaturas de reacción se escogen típicamente para que estén próximas, ligeramente por debajo, o algunas veces ligeramente por encima, de la T_m del oligómero para su diana. Si la temperatura de reacción es demasiado elevada, el oligómero no se hibridará a su secuencia diana, y se reducirá la eficiencia de la extensión del cebador o de la escisión de la sonda.

La presente invención también proporciona métodos para usar un oligómero polinucleotídico de la invención que comprende una base de timina modificada (también denominada como un "oligómero polinucleotídico modificado") en métodos de hibridación. En un método para hibridación, se puede usar cualquiera de las bases de timina modificadas descritas aquí. En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para la hibridación de un oligómero polinucleotídico que comprende una base de timina modificada con una secuencia diana de ácido nucleico que se sospecha que está presente en una mezcla de reacción, en el que este método comprende las etapas de incubar una mezcla de reacción que comprende el oligómero polinucleotídico modificado y que se sospecha que comprende una secuencia de ácido nucleico diana, en condiciones favorables para la hibridación del oligómero polinucleotídico modificado a la secuencia de ácido nucleico diana si está presente en la mezcla de reacción, y detectar la presencia o confirmar la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción. El oligómero polinucleotídico modificado en ese método es complementario a una secuencia en la secuencia diana de ácido nucleico que se sospecha que está presente en la mezcla de reacción, y comprende al menos una base modificada representada por la fórmula:



en la que Z es CH_2 u O.

En una realización particular de la presente invención, el oligómero polinucleotídico modificado usado en ese método es complementario a una secuencia en la secuencia diana de ácido nucleico que se sospecha que está presente en la mezcla de reacción, y comprende al menos una base modificada representada por la fórmula:



en la que Z es O.

La mezcla de reacción se incuba, formando de ese modo un dúplex entre el oligómero polinucleotídico modificado y la secuencia de ácido nucleico diana si está presente en la mezcla de reacción. La presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción se detecta como resultado de la formación de tal dúplex. La ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción se confirma como resultado de la falta de formación de tal dúplex. En algunas realizaciones del método, el oligómero polinucleotídico modificado comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un marcador detectable, un fluoróforo y un inhibidor de la fluorescencia. Un marcador detectable, fluoróforo y/o inhibidor de la fluorescencia facilitan la detección del dúplex y/o de la secuencia de ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una muestra biológica. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una muestra de ácido nucleico preparada a partir de una muestra biológica. La preparación de una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra biológica es bien conocida en la técnica.

Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, los métodos de hibridación para detectar la presencia o confirmar la ausencia de ácidos nucleicos diana en una muestra se pueden llevar a cabo con cualquier ácido nucleico diana en tanto que esté disponible cierta información de la diana de manera que se pueda preparar un oligómero polinucleotídico modificado que tenga al menos cuatro nucleótidos complementarios contiguos al ácido nucleico diana.

4. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados como cebadores

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la invención se usa como un cebador. Un cebador, como se usa aquí, y denominado algunas veces como cebador modificado, es un oligómero polinucleotídico modificado que es capaz de hibridarse específicamente a una secuencia diana, o de ser extendido en un extremo, habitualmente un extremo 3', mediante una ADN o ARN polimerasa dependiente del molde. En presencia de un molde, una polimerasa y amortiguadores y reactivos adecuados, el cebador modificado se puede extender para formar un producto de extensión del cebador modificado (también denominado como un cebador extendido), que es complementario a la secuencia diana. En algunas realizaciones, el cebador modificado comprende un marcador, o uno o más de los precursores para polimerización (por ejemplo, trifosfatos de nucleósido) pueden comprender un marcador. El producto o productos de extensión del cebador modificado se pueden detectar por cualquier número de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el cebador modificado no está marcado. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado se usa como un cebador para amplificación.

5. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados para amplificación

En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado de la invención se usa en reacciones de amplificación. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, las reacciones de amplificación, en las que se puede usar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención, no están limitadas. Los ejemplos de amplificaciones no limitantes ejemplares incluyen reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR múltiple, PCR cuantitativa (Q-PCR), amplificación a base de secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de círculo rodante (RCA), o amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). De este modo, en algunas realizaciones, se proporciona un método para la amplificación. En algunas realizaciones, este método comprende las etapas de (a) hibridar un cebador polinucleotídico modificado a una secuencia diana, y (b) extender el oligómero polinucleotídico modificado para formar un producto de extensión del oligómero polinucleotídico modificado.

En algunas realizaciones del método para amplificación, el oligómero polinucleotídico modificado está unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones del método para amplificación, el oligómero polinucleotídico modificado está unido a una perla. En algunas realizaciones del método para amplificación, el oligómero polinucleotídico modificado está unido a una matriz. En algunas realizaciones del método para amplificación, el oligómero polinucleotídico modificado está unido a una micromatriz.

Muchas reacciones de amplificación, tal como la PCR, utilizan la polimerización reiterativa dependiente de cebadores. En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado es un cebador que es capaz de hibridarse a una secuencia de ácido nucleico diana, y una vez hibridado, es capaz de ser extendido por una enzima polimerizante (en presencia de sustratos nucleotídicos, tal como trifosfatos de nucleótido), usando como molde la secuencia de ácido nucleico diana. Las enzimas polimerizantes incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN

polimerasas, transcriptasas inversas, etc. Las condiciones favorables para la polimerización mediante diferentes enzimas polimerizantes son bien conocidas por aquellos de pericia en la técnica.

5 La reacción de amplificación se lleva a cabo preferiblemente en un ciclador térmico automatizado, para facilitar tiempos de incubación a temperaturas deseadas. En algunas realizaciones, la amplificación comprende al menos un ciclo de los procedimientos secuenciales de: hibridación de al menos un cebador (es decir, un oligómero polinucleotídico modificado) con una secuencia complementaria o sustancialmente complementaria en al menos un ácido nucleico diana; sintetizar al menos una hebra de nucleótidos de una manera dependiente del molde usando una polimerasa; y desnaturalizar el dúplex de ácido nucleico recientemente formado, para separar las hebras. El ciclo se puede repetir o no. La amplificación puede comprender la termociclación, o se puede llevar a cabo isotérmicamente.

10 En algunas realizaciones, la amplificación comprende una desnaturalización inicial a alrededor de 90°C a alrededor de 100°C durante alrededor de 1 a alrededor de 10 minutos, seguido de ciclación que comprende hibridación a alrededor de 55°C a alrededor de 75°C durante alrededor de 1 a alrededor de 30 segundos, extensión a alrededor de 55°C a alrededor de 75°C durante alrededor de 5 a alrededor de 60 segundos, y desnaturalización a alrededor de 90°C a alrededor de 100°C durante alrededor de 1 a alrededor de 30 segundos. También se pueden usar otros tiempos y perfiles. Por ejemplo, la hibridación y extensión del cebador se pueden llevar a cabo en la misma etapa, a una única temperatura.

15 En algunas realizaciones, el ciclo se lleva a cabo al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, o al menos 45 veces.

Los tiempos y temperaturas particulares del ciclo dependerán de la secuencia de ácido nucleico particular que se esté amplificando, y se pueden determinar fácilmente por una persona de pericia normal en la técnica.

6. Uso de oligómeros polinucleotídicos modificados en aplicaciones terapéuticas

25 En algunas realizaciones, un oligómero polinucleotídico modificado encuentra utilidad en aplicaciones terapéuticas. Como apreciará alguien de pericia normal en la técnica, las aplicaciones terapéuticas, en las que se puede usar un oligómero polinucleotídico modificado de la presente invención, no están limitadas. Los ejemplos no limitantes de aplicaciones terapéuticas ejemplares incluyen el uso de un polinucleótido modificado como un oligómero antisentido o ARNpi que se une a ARN, el uso de un polinucleótido modificado como un oligonucleótido antisentido que se une a ADN, el uso de un polinucleótido modificado como un aptámero, el uso de un polinucleótido modificado como un señuelo, o el uso de un polinucleótido modificado como un oligómero de CpG que se une a proteínas. Los oligómeros polinucleotídicos modificados se pueden usar para regular la expresión de genes, y en terapia genética antisentido.

30 Se describen aquí realizaciones preferidas de la invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, variaciones, cambios, modificaciones y sustitución de equivalentes en esas realizaciones preferidas serán manifiestas para aquellos de pericia normal en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones, cambios, modificaciones y sustitución de equivalentes según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto a la descrita específicamente aquí. Aquellos de pericia en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se podrían cambiar, alterar o modificar para producir resultados esencialmente similares. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones anejas aquí, según esté permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus variaciones posibles está englobada por la invención excepto que se indique de otro modo aquí o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.

35 Aunque cada uno de los elementos de la presente invención se describe aquí como si contiene múltiples realizaciones, se debería entender que, excepto que se indique de otro modo, cada una de las realizaciones de un elemento dado de la presente invención es capaz de ser usada con cada una de las realizaciones de los otros elementos de la presente invención, y cada uno de tal uso está destinado a formar una realización distinta de la presente invención.

40 Cualquier conflicto entre una definición de una palabra o frase entendida por la técnica y una definición de la palabra o frase como se enseña específicamente en esta memoria descriptiva se debería resolver a favor de esta última.

45 Como se puede apreciar a partir de la descripción anterior, la presente invención tiene una amplia variedad de aplicaciones. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar de ninguna manera la definición y alcance de la invención.

V. Ejemplos

50 Métodos generales y recomendaciones

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la invención descrita aquí.

Todas las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo en argón (Ar). Los disolventes y reactivos anhidros se obtuvieron de fuentes comerciales, excepto que se señale de otro modo. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo en gel de sílice de malla 230-400 (VWR).

- 5 Los espectros de RMN ^1H se realizaron a 20°C en un espectrómetro Bruker 400, y se dan en ppm con respecto a los patrones Me_4Si para ^1H y H_3PO_4 para ^{31}P .

Los puntos de fusión se determinaron usando un aparato de puntos de fusión Mel-Temp en capilar abierto, y no estaban corregidos.

- 10 Los espectros de absorción de UV-visible se registraron en el intervalo de 200-400 nm en un espectrofotómetro Cary Varian.

La cromatografía de capa fina se llevó a cabo en placas de TLC con soporte de aluminio F-254 de gel de sílice 60 (EM Reagents).

- 15 Los análisis de HPLC se realizaron en un instrumento Agilent 1100, equipado con una bomba cuaternaria, un automuestreador, y un detector de matriz de diodos, y, excepto que se señale de otro modo, se monitorizó la absorbancia a 270 nm.

- 20 La síntesis oligonucleotídica se llevó a cabo en un sintetizador MerMade 12 DNA (BioAutomation). Se usaron ciclos estándar de síntesis de fosforamidito, y el tiempo de acoplamiento se incrementó hasta 360 segundos para fosforamiditos modificados. Para todos los experimentos de fusión, la concentración de cada oligonucleótido fue 1 μM , y el contenido del amortiguador fue MgCl_2 3 mM, KCl 15 mM, HEPES 25 mM, pH 8. La escisión desde el soporte sólido, y la desprotección, se llevaron a cabo en amoníaco acuoso concentrado a RT durante 24 h.

- 25 La práctica de la presente invención empleará, excepto que se indique de otro modo aquí, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, microbiología, virología, ADN recombinante, etc., que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989), *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait Ed., 1984), *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, Ed., 1987), la serie *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos eds. 1987), *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987).

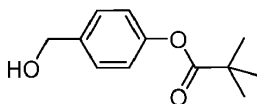
En los siguientes ejemplos específicos, los esquemas de reacción relevantes siguen los ejemplos.

30 **Ejemplo 1. Síntesis de fosforamidito de DMT-T^{BP} (M5)**

El Ejemplo 1 describe un procedimiento sintético para preparar una forma protegida de un monómero M5 de 3'-fosforamidito de timina modificado, que comprende un resto de fosfato protegido enlazado al carbono 5 de pirimidina mediante un enlazador de 1-butililo (denominado T^{BP}). El 5'-hidroxilo de M5 está protegido por un grupo DMT, y los dos grupos hidroxilo del resto de fosfato están protegidos por grupos pivaloiloibencilo.

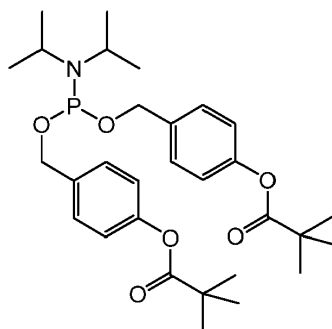
- 35 5'-O-DMT-5-Yodo-2'-desoxiuridina. Este compuesto se sintetizó siguiendo en general el procedimiento descrito en Ahmadian, M., Zhang, P., y Bergstrom, D.E. (1998) *Nucl. Acids Res.*, v.26, No. 13, p. 3127-3135.

Alcohol 4-pivaloiloibencilico (Compuesto M1).



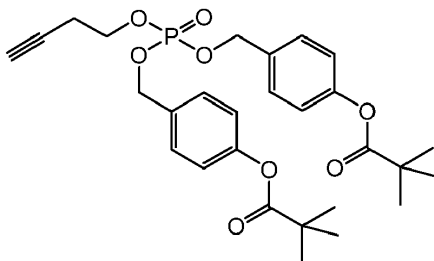
- 40 A una disolución agitada de alcohol 4-hidroxibencilico (6,21 g, 50 mmoles) en THF anhidro (50 ml) que contiene trietilamina (10,43 ml, 75 mmoles) se añadió gota a gota cloruro de pivaloilo (6,79 ml, 55 mmoles) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Tras agitarla durante 60 min., la mezcla de reacción se paralizó con agua (0,2 ml) y se dejó toda la noche. Después se diluyó con EtOAc (~400 ml) y se lavó con NaHCO_3 saturado (3 x 100 ml) y salmuera (100 ml). Después se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,4 en acetato de etilo/hexanos (4:6)) se aisló usando cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 20 cm), eluyendo con acetato de etilo/hexanos (4:6). Las fracciones puras se reunieron, se concentraron y se secaron a vacío para dar 7,75 g (74%) de aceite incoloro. ^1H RMN (DMSO-d_6): δ 7,35 (d, 2H, $J=8,6$ Hz), 7,04 (d, 2H, $J=8,6$ Hz), 5,22 (t, 1H), 4,50 (d, 2H), 1,31 (s, 9H).

Compuesto M2.



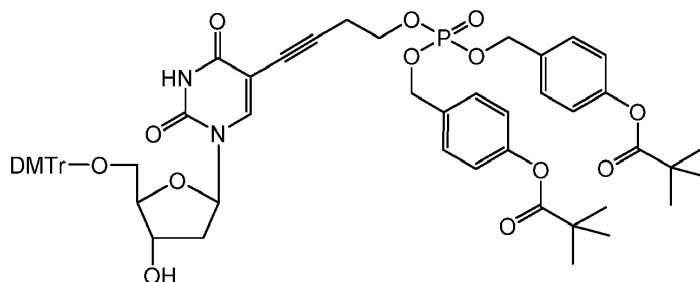
5 El compuesto M1 (véase anteriormente; 7,79 g, 37,4 mmoles) se disolvió en THF anhidro (50 ml) que contiene N,N-diisopropiletilamina (8,14 ml, 46,8 mmoles) bajo argón, y la disolución resultante se enfrió hasta 0°C en un baño de agua con hielo. Se añadió gota a gota dicloruro diisopropilfosforamidoso (3,46 ml, 18,8 mmoles) vía una jeringuilla durante un período de 5 minutos, con agitación y enfriamiento. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó toda la noche. Las sales precipitadas se eliminaron mediante filtración, y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo (~150 ml) y se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 50 ml), seguido de salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,6 en acetato de etilo/hexanos/trietilamina (20:80:2)) se aisló usando cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 20 cm), cargando desde hexanos/trietilamina (100:2) y eluyendo con acetato/hexanos/trietilamina (20:80:2). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron para dar 8,1 g (79%) de aceite incoloro. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 7,37 (d, 4H, J=8,6 Hz), 7,07 (d, 4H, J=8,6 Hz), 4,76 - 4,63 (m, 4H), 3,70 - 3,61 (m, 2H), 1,30 (s, 18H), 1,16 (d, 12H, J=6,8 Hz). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ 147,30.

Compuesto M3.



15 Se disolvieron 3-butin-1-ol (1,18 ml, 15,0 mmoles) y Compuesto M2 (véase más abajo; 8,1 g, 14,8 mmoles) en THF anhidro bajo una atmósfera de argón. Se añadió de una vez una disolución de 5-(etilto)-1H-tetrazol (66 ml, 0,25 M en acetonitrilo), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió disolución de hidroperóxido de *terc*-butilo (4,0 ml, 5-6 M en decano), y la mezcla se agitó durante 2 horas adicionales. Los disolventes se eliminaron entonces a vacío, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (200 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,35 en acetato de etilo/hexanos (1:1)) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, usando un gradiente por etapas de 20 - 50% acetato de etilo en hexanos. Se obtuvo un sólido amorfo 5,3 g (67%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 7,42 (d, 4H, J=8,6 Hz), 7,11 (d, 4H, J=8,6 Hz), 5,07 (d, 4H, J=8,2 Hz), 4,07 - 4,01 (m, 2H), 2,93 (t, 1H, J=2,6 Hz), 2,56 - 2,52 (m, 2H), 1,31 (s, 18H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ -1,2.

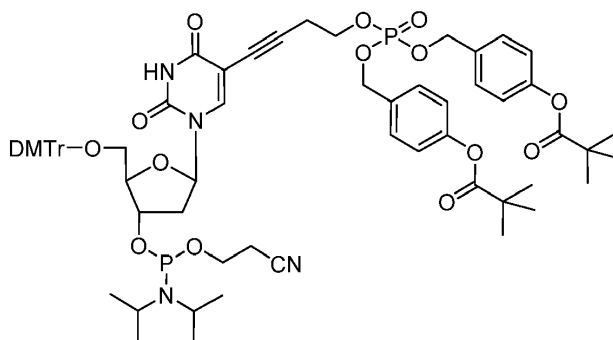
Compuesto M4.



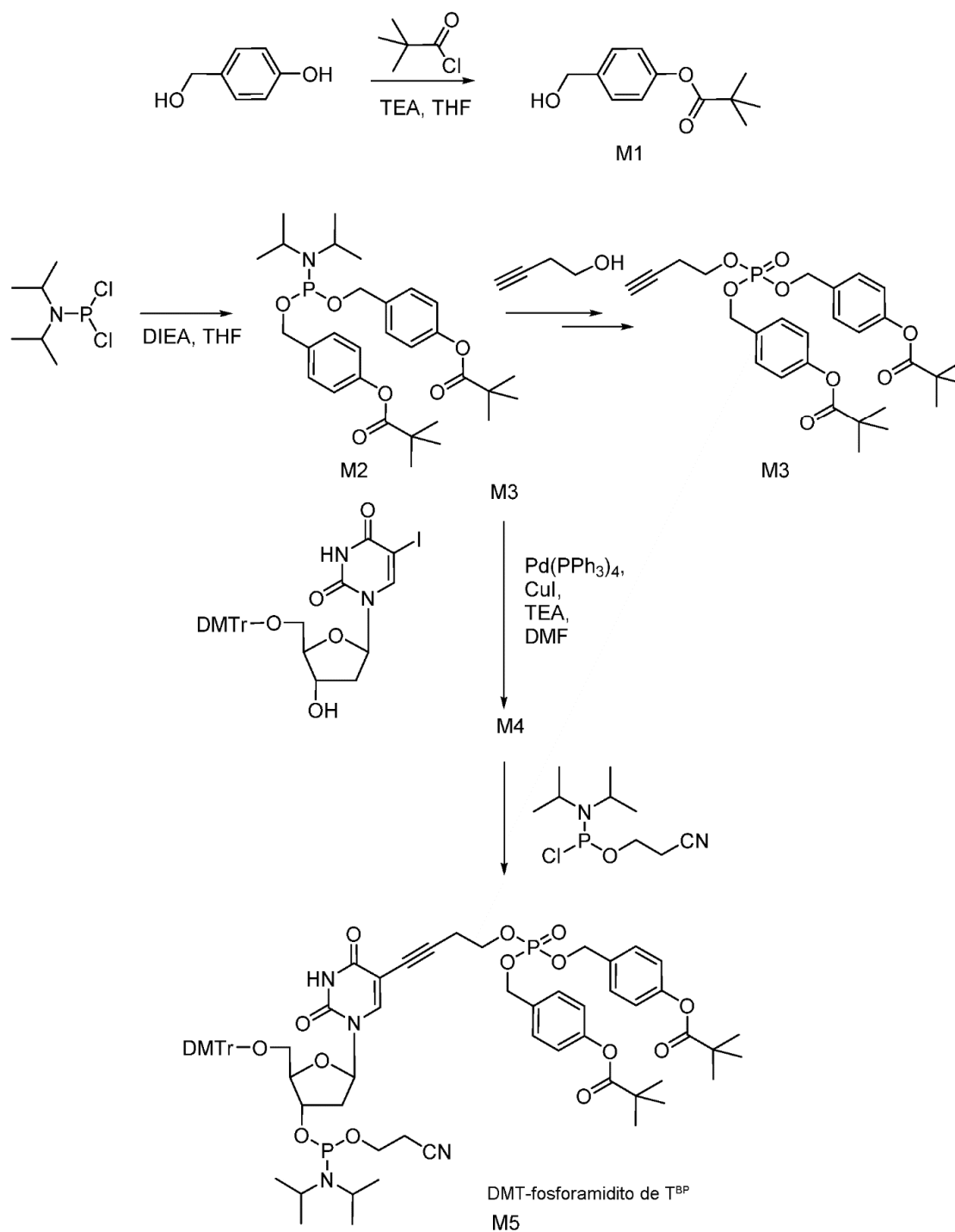
Se combinó 5'-O-DMT-5-yodo-2'-desoxiuridina (656 mg, 1 mmol) con Pd(PPh₃)₄ (116 mg, 0,1 mmoles), yoduro de cobre(I) (38 mg, 0,2 mmoles) y compuesto M3 (véase anteriormente; 637 mg, 1,2 mmoles) en un matraz de fondo

redondo equipado con una barra agitadora magnética. El matraz se vació y se llenó con gas argón, se cerró herméticamente con un tabique y un balón de argón. Se añadieron N,N-dimetilformamida (10 ml) y trietilamina (697 μ l, 5 mmoles) usando una jeringa a través del tabique, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de Ar. El progreso de la reacción se controló usando RP HPLC o TLC C₁₈, monitorizando la desaparición del nucleósido de partida. Después de 12 a 72 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con Na₂EDTA 0,1 M (2 x 50 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró hasta un aceite. El producto de la reacción (TLC: R_f ~0,5 en acetato de etilo) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 20 cm), cargando desde acetato de etilo/hexanos (2:1) y eluyendo con acetato de etilo puro. Se obtuvo un sólido cristalino parduzco 576 mg (576 mg, 54%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 11,64 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,41 - 6,87 (m, 21H), 6,12 (t, 1H), 5,34 (d, 1H), 5,04 (d, 4H), 4,34 - 4,29 (m, 1H), 3,95 - 3,87 (m, 3H), 3,72 (s, 6H), 3,28 - 3,05 (m, 2H), 2,56 - 2,52 (m, 2H), 2,29 - 2,15 (m, 2H), 1,30 (s, 18H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ -1,31.

DMT Fosforamidito de T^{BP} (Compuesto M5).



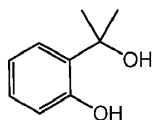
A una disolución agitada de compuesto M4 (véase anteriormente; 576 mg, 0,54 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) que contiene N,N-diisopropiletilamina (348 μ l, 2,0 mmoles) mantenida a 0°C se añadió gota a gota N,N-diisopropilclorofosforamidito de 2-cianoetilo (159 μ l, 0,71 mmoles) bajo argón. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y después de 30 min. se añadió metanol (0,1 ml). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml), y se lavó con NaHCO₃ acuoso al 5% (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró hasta un aceite. El producto bruto se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (3 x 15 cm) en acetato de etilo/trietilamina (100:2). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron a vacío para dar una espuma blancuzca (M5, 350 mg, 51%). RMN ³¹P (DMSO-d₆): δ 147,54, 147,19.



Ejemplo 2. Síntesis de DMT-Fosforamidito de T^{PP} (M10)

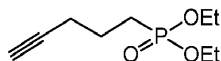
El Ejemplo 2 describe un procedimiento sintético para preparar una forma protegida de un monómero de 3'-fosforamidito de timina modificado, Compuesto M10, que comprende un resto de fosfonato protegido cuyo átomo de fósforo está enlazado al carbono 5 de pirimidina mediante un enlazador 1-pentínilico (denominado T^{PP}). El 5'-hidroxilo de M10 está protegido mediante un grupo DMTr, y los dos grupos hidroxilo del resto de fosfato están protegidos mediante un grupo protector α,α -dimetil-o-bencilénico.

2-(Hidroxil-1-metil-etil)-fenol (Compuesto M6).



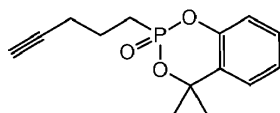
Este compuesto se sintetizó siguiendo el protocolo descrito en: Johnsson, R., Mani, K., Cheng, F., Ellervik, U. (2006) J. Org. Chem., v. 71, p. 3444-3451.

Compuesto M7.



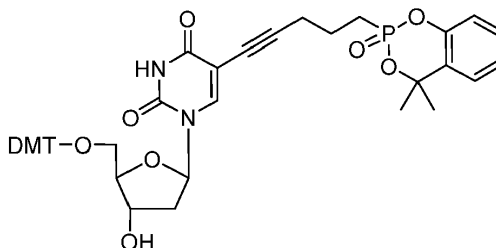
- 5 Un matraz de fondo redondo de 100 ml ajustado con un condensador de aire se cargó con 5-cloro-1-pentino (15,0 ml, 0,14 moles) y fosfito de trietilo (25,7 ml, 0,15 moles). El contenido del matraz se calentó hasta reflujo (baño de aceite mineral a 120°C). El reflujo se continuó intermitentemente durante 2 semanas, durante cuyo tiempo la temperatura de ebullición se elevó gradualmente hasta 180°C. En ese tiempo, solo fueron detectables en la mezcla de reacción trazas de fosfito de trietilo mediante RMN ³¹P. El calentamiento se discontinuó, y la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se destiló a vacío a ~1 mm, Hg. La fracción que hierve a 91 – 92°C/~1 mm se recogió produciendo 14,0 g (48%) de líquido incoloro. ¹H RMN (DMSO-d₆): μ l 4,04 - 3,93 (m, 4H.), 2,82 (t, 1H), 2,26 (dt, 2H), 1,85 - 1,74 (m, 2H), 1,69 - 1,58 (m, 2H), 1,23 (t, 6H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ 31,20.

Compuesto M8.



- 15 El compuesto M7 (véase anteriormente; 2,04 g, 10,0 mmoles) se disolvió en bromotrimetilsilano (3,96 ml, 30,0 mmoles) a temperatura ambiente en una atmósfera de Ar, y se mantuvo cerrado herméticamente toda la noche en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Los volátiles se eliminaron a presión reducida, y el residuo se desecó a alto vacío durante media hora. El contenido del matraz se disolvió en diclorometano anhidro (10 ml) que contiene N,N-dimetilformamida (0,1 ml), y se enfrió a -20°C bajo argón. La disolución se trató con cloruro de oxalilo (3,43 ml, 40,0 mmoles) gota a gota con agitación. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante 2 horas. Después se evaporó a presión reducida, y el residuo se desecó durante 1 h a alto vacío. El sólido amarillento que queda se disolvió en diclorometano anhidro (5,0 ml), y la disolución resultante se enfrió hasta -20°C. Una disolución de compuesto M6 (véase anteriormente; 1,52 g, 10,0 mmoles) en diclorometano (5 ml) que contiene N,N-diisopropiletilamina (6,96 ml, 40,0 mmoles) se añadió gota a gota con agitación. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, se agitó toda la noche, y después se diluyó con acetato de etilo (150 ml). La disolución resultante se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,2 en acetato de etilo/hexanos (1:1) o R_f ~0,6 en acetato de etilo) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente por etapas de 20 - 80% de acetato de etilo en hexanos. Rendimiento: 2,05 g (78%; aceite ligeramente coloreado). ¹H RMN (DMSO-d₆): μ l 7,43 - 7,35 (m, 2H), 7,23 - 7,13 (m, 2H), 2,79 (t, 1H), 2,24 (t a, 2H), 1,99 - 1,89 (m, 2H), 1,73 (ds, 6H), 1,68 - 1,57 (m, 2H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ 22,34.

Compuesto M9.

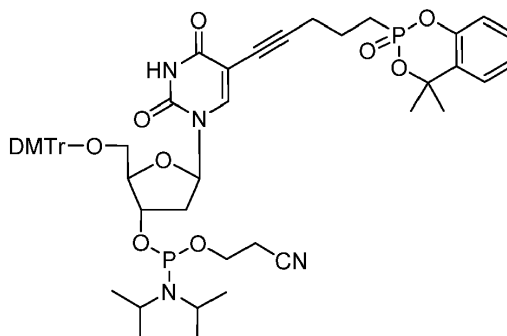


- 35 Se combinó 5'-O-DMT-5-yodo-2'-desoxiuridina (984 mg, 1,5 mmoles) con Pd(PPh₃)₄ (173 mg, 0,15 mmoles), yoduro de cobre(I) (57 mg, 0,3 mmoles) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora magnética. El matraz se vació y se llenó con gas argón, se cerró herméticamente con un tabique y un balón de argón. Se añadió una disolución de compuesto M8 (véase anteriormente; 517 mg, 1,95 mmoles) y trietilamina (1,05 ml, 7,5 mmoles) en N,N-dimetilformamida (20 ml) usando una jeringa a través del tabique, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de Ar. Después de 15 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con Na₂EDTA 0,1 M (2 x 50 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró hasta un aceite. El producto M10 de la reacción (TLC: R_f ~0,25 en acetato de etilo) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 20 cm), cargando con acetato de etilo/diclorometano (1:1) y eluyendo con un gradiente por etapas de 0 - 15% de

acetona en acetato de etilo. Se obtuvo una espuma amarillenta (727 mg, 61%). ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 11,62 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,42 - 7,06 (m, 13H), 6,89 - 6,86 (m, 4H), 6,12 (t, 1H), 5,34 (d, 1H), 4,33 - 4,28 (m, 1H), 3,95 - 3,90 (m, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,29 - 3,23 (m, 1H), 3,11 - 3,07 (m, 1H), 2,30 - 2,19 (m, 4H), 1,94 - 1,85 (m, 2H), 1,72 (ds, 6H), 1,61 - 1,52 (m, 2H). ^{31}P RMN (DMSO- d_6): δ 22,43.

5

Compuesto M10.

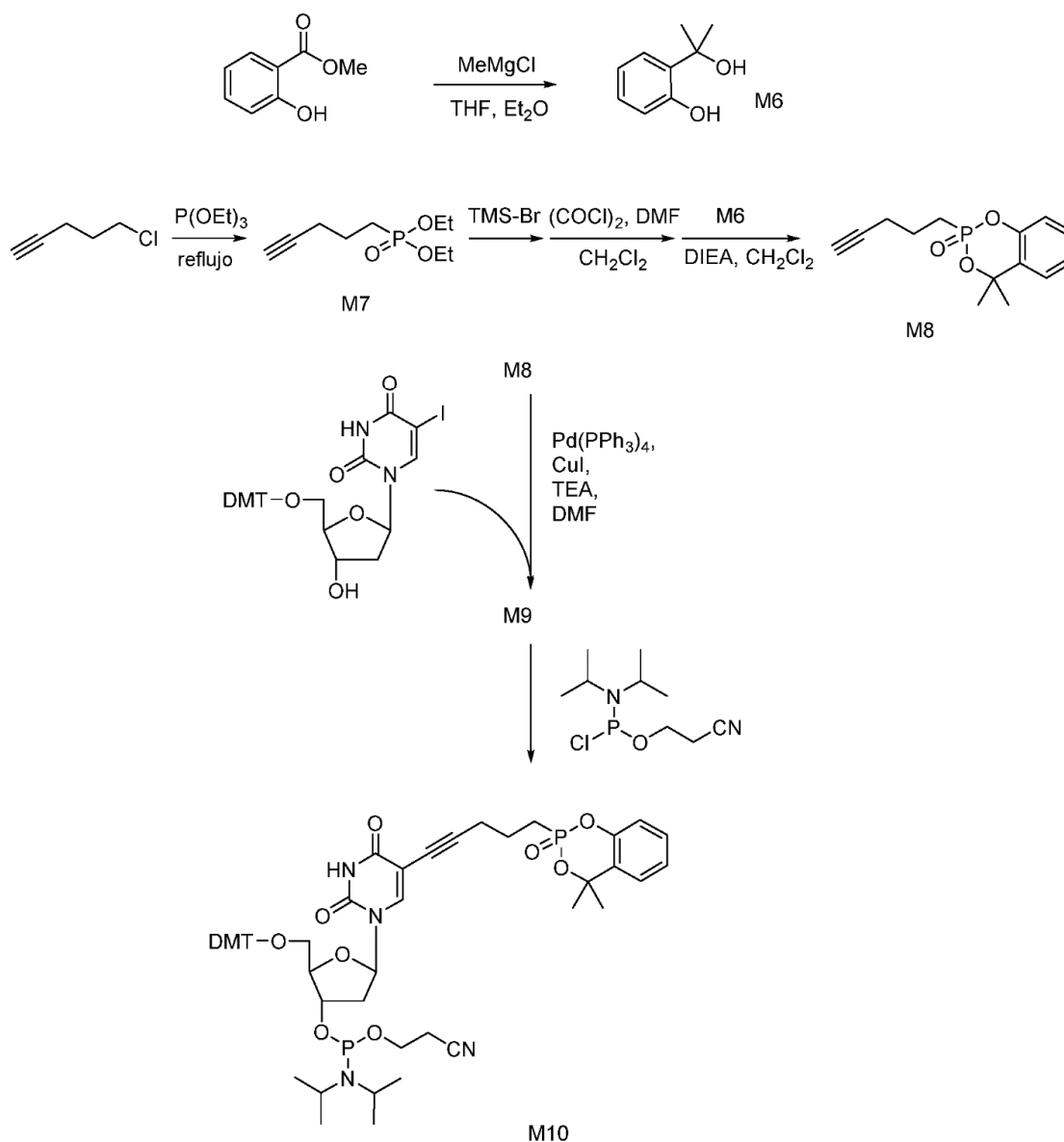


10

A una disolución agitada de compuesto M9 (véase anteriormente; 698 mg, 0,88 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (15 ml) que contiene N,N-diisopropiletilamina (522 μl , 3,0 mmoles) mantenida a 0°C se añadió gota a gota N,N-diisopropilclorofosforamidito de 2-cianoetilo (254 μl , 1,14 mmoles) bajo argón. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y después 30 min. se añadió metanol (0,1 ml). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml), y se lavó con NaHCO_3 acuoso al 5% (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 , y se concentró hasta un aceite. El producto (TLC: $R_f \sim 0,35$ en acetato de etilo/acetonitrilo/trietilamina (80:20:2)) se aisló usando cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (3 x 20 cm), eluyendo con un gradiente por etapas de 0 - 20% de acetonitrilo en acetato de etilo/trietilamina (100:2).

15

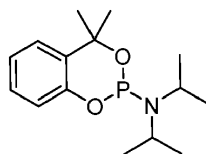
Las fracciones puras se reunieron y se concentraron a presión reducida para dar una espuma cremosa (488 mg, 56%). RMN ^{31}P (DMSO- d_6): δ 147,58, 147,19, 22,42, 22,40.



Ejemplo 3. Síntesis de DMT-T^{BP}-1 Fosforamidito M14

El Ejemplo 3 describe un procedimiento sintético para preparar una forma protegida de un monómero de 3'-fosforamidito de timina modificado M14, que, al igual que M5 anterior, comprende un resto de fosfato, pero al igual que el fosfonato en M10, el resto de fosfato en M14 está protegido mediante un grupo protector α,α -dimetil-*o*-bencilénico.

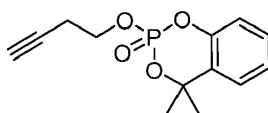
Compuesto M11.



El compuesto M6 (véase anteriormente; 3,42 g, 22,5 mmoles) se disolvió en THF anhidro (50 ml) bajo argón, y la disolución resultante se enfrió hasta -20°C en un baño de acetona-hielo seco. Se añadió gota a gota dicloruro diisopropilfosforamidoso (5,0 g, 24,7 mmoles) con agitación y enfriamiento, seguido de N,N-diisopropiletamina (9,80 ml, 56,3 mmoles). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante una hora. Después se diluyó con acetato de etilo (~150 ml) y se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 50 ml) seguido de salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,85 en hexanos/trietilamina (100:2)) se aisló usando cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 20

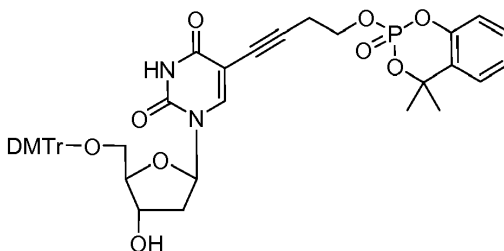
cm), eluyendo con hexanos/trietilamina (100:2). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron para dar 5,58 g (88%) de aceite incoloro que solidificó al almacenarlo a -20°C. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 7,23 - 7,13 (m, 2H), 6,97 - 6,82 (m, 2H), 3,67 - 3,54 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,19 - 1,14 (m, 12H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ 130,75.

Compuesto M12.



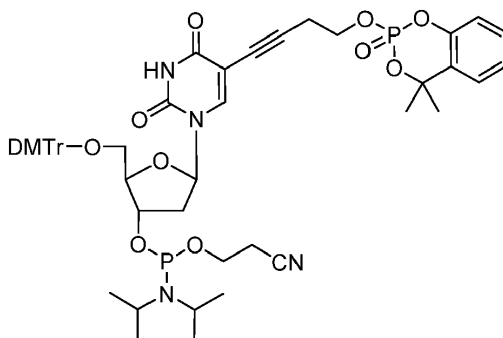
5 Se disolvieron 3-butin-1-ol (1,50 ml, 18,9 mmoles) y compuesto M11 (véase anteriormente; 5,58 g, 19,8 mmoles) en acetonitrilo anhidro (50 ml) bajo una atmósfera de argón. Se añadió de una vez una disolución de 5-(etilio)-1*H*-tetrazol (87 ml, 0,25 M en acetonitrilo), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió disolución de hidroperóxido de *terc*-butilo (5,0 ml, 5-6 M en decano), y la mezcla se agitó durante 2 horas adicionales. Los disolventes se eliminaron entonces a vacío, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (200 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto (TLC: R_f ~0,33 en acetato de etilo/hexanos (1:1)) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, usando un gradiente por etapas de 30 - 50% de acetato de etilo en hexanos. Se obtuvo un aceite incoloro 4,79 g (91%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 7,45 - 7,35 (m, 2H), 7,25 - 7,13 (m, 2H), 4,13 - 4,05 (m, 2H), 2,85 (t, 1H, *J*=2,7 Hz), 2,55 - 2,49 (m, 2H), 1,79 (s, 3H), 1,73 (s, 3H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ - 12,45.

Compuesto M13.

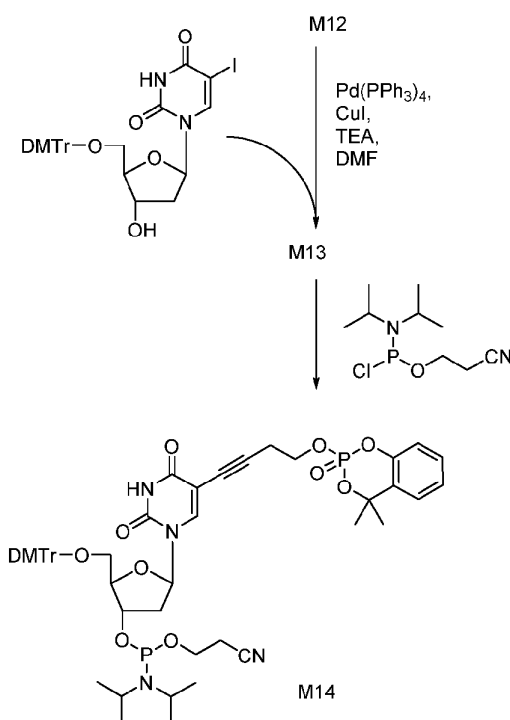
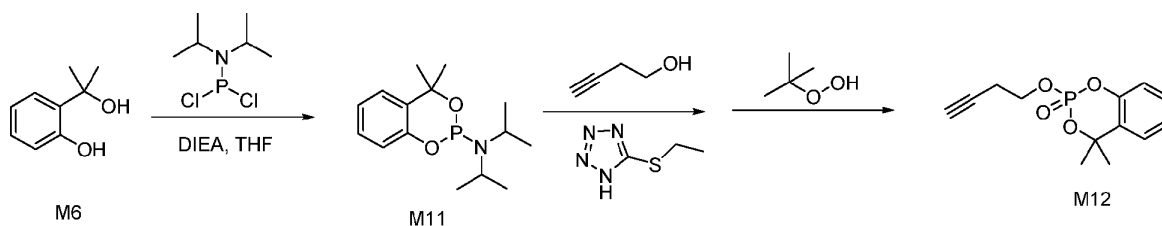


20 Se combinó 5'-O-DMT-5-yodo-2'-desoxiuridina (1,97 g, 3,0 mmoles) con Pd(PPh₃)₄ (346 mg, 0,3 mmoles), yoduro de cobre(I) (114 mg, 0,6 mmoles) y compuesto M12 (véase anteriormente; 1,04 g, 3,9 mmoles) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora magnética. El matraz se vació y se llenó con gas argón, se cerró herméticamente con un tabique y un balón de argón. Se añadieron N,N-dimetilformamida (40 ml) y trietilamina (2,09 ml, 15 mmoles) usando una jeringa a través del tabique, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de Ar. El progreso de la reacción se controló usando HPLC o TLC RP C₁₈, monitorizando la desaparición del nucleósido de partida. Después de 15 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (~150 ml) y se lavó con Na₂EDTA 0,1 M (2 x 50 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró hasta un aceite. El producto de la reacción (TLC: R_f ~0,35 en acetato de etilo) se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (4 x 25 cm), cargando desde acetato de etilo/DCM (1:1) y eluyendo con acetato de etilo puro. Las fracciones puras se reunieron y se concentraron a vacío. Se obtuvo una espuma cremosa (1,61 g, 68%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 11,65 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,42 - 6,87 (m, 17H), 6,12 (t, 1H), 5,36 (d, 1H), 4,33 - 4,27 (m, 1H), 3,96 - 3,87 (m, 3H), 3,73 (s, 6H), 3,28 - 3,07 (m, 2H), 2,56 - 2,49 (m, 2H), 2,30 - 2,17 (m, 2H), 1,74 (s, 3H), 1,71 (s, 3H). ³¹P RMN (DMSO-d₆): δ -12,52.

Compuesto M14.



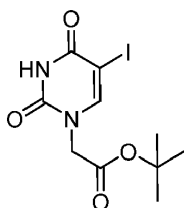
5 A una disolución agitada de compuesto M13 (véase anteriormente; 1,59 g, 2,0 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (20 ml) que contiene N,N-diisopropiletilamina (869 μl, 5,0 mmoles) mantenida a 0°C se añadió gota a gota N,N-diisopropilclorofosforamido de 2-cianoetilo (581 μl, 2,6 mmoles) bajo argón. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y después de 30 min. se añadió metanol (0,1 ml). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (~150 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso al 5% (3 x 50 ml), y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró hasta un aceite. El producto bruto se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (4 x 20 cm), cargando desde acetato de etilo/hexanos/trietilamina (80:20:2) y eluyendo con un gradiente por etapas de 0-20% de acetonitrilo en acetato de etilo/trietilamina (100:2). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron a vacío para dar una espuma blancuzca (1,42 g, 71%). RMN ³¹P (DMSO-d₆): δ 147,55, 147,15, -12,51.



Ejemplo 4. Síntesis de monómero PNA-T^{BP}

15 El Ejemplo 4 describe un procedimiento sintético para preparar una forma protegida de un monómero de PNA de timina modificado M19, que comprende un resto T^{BP} enlazado a una cadena principal de monómero de PNA. El monómero comprende un resto de fosfato que está protegido mediante un grupo protector α,α-dimetil-o-bencilénico.

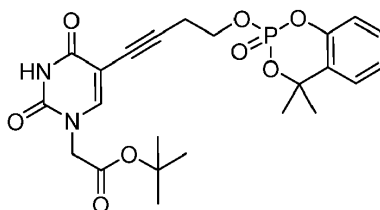
Compuesto M15.



Se disolvió 5-yodouracilo (7,40 g, 31 mmoles, 1 eq) en 100 ml de DMF anhidra bajo argón, y se añadió K₂CO₃ sólido (4,73 g, 34,2 mmoles, 1,1 eq). La disolución se enfrió hasta 0°C, y se añadió gota a gota durante 5 min.

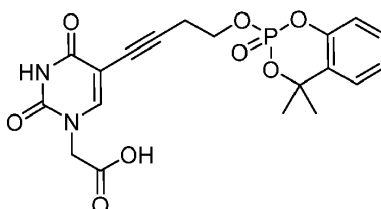
5 bromoacetato de t-butilo (4,59 ml, 31 mmoles). Tras agitar durante 5 min. a 0°C, la mezcla de reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado que se formó se eliminó mediante filtración, se lavó con DMF, y el filtrado se evaporó. El residuo se repartió entre 300 ml de acetato de etilo y 150 ml de agua, la capa orgánica se separó, se lavó con agua (3 x 100 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. Tras eliminar el agente de secado mediante filtración, la disolución se evaporó para producir 9,43 g (86%) del producto, que se usó en la etapa siguiente sin purificaciones adicionales. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,42 (s, 9H), 4,39 (s, 2H), 8,20 (s, 1H), 11,76 (s, 1H). LC/MS m/z 353,1 (M+H⁺).

Compuesto M16.



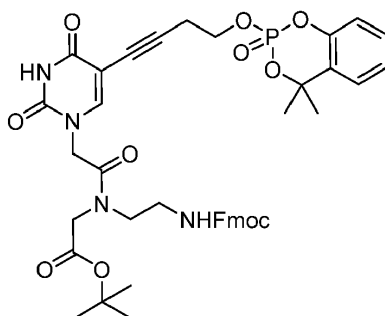
10 Se disolvieron compuesto M15 (véase anteriormente; 6,45 g, 18,3 mmoles) y compuesto M12 (véase anteriormente; 4,88 g, 18,3 mmoles) en 75 ml de DMSO anhidro bajo argón en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora magnética, y se añadieron Pd(PPh₃)₄ (2,12 g, 1,8 mmoles), yoduro de cobre(I) (349 mg, 1,8 mmoles) y trietilamina (12,75 ml, 91,5 mmoles). La disolución se calentó hasta 65°C y se agitó a 65°C durante 12 h, después se dejó agitar a temperatura ambiente toda la noche. La TLC mostró conversión incompleta, se añadió CuI (349 mg, 1,8 mmoles), y la mezcla se calentó hasta 65°C durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (400 ml) y se lavó con agua (400 ml), Na₂EDTA 0,1 M (2 x 250 ml), agua (250 ml) y salmuera (250 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta un aceite. El producto de la reacción se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (7 x 18 cm), eluyendo con un gradiente por etapas de 1 - 4% de metanol en diclorometano para producir 3,62 g, (40%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,40 (s, 9H), 1,73 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 2,76 (t, 2H), 4,14 (m, 2H), 4,40 (s, 2H), 7,14-7,42 (m, 4H), 7,91 (s, 1H), 11,69 (s, 1H).

Compuesto M17.



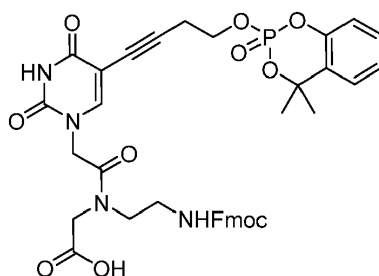
25 Se disolvió éster t-butílico M16 (véase anteriormente; 3,59 g, 7,3 mmoles) en 20 ml de diclorometano, y la disolución se enfrió hasta 0°C. A la disolución se añadió TFA (20 ml) en porciones de 1,5 ml durante 1 minuto. La reacción se dejó transcurrir a 0°C durante 20 min., y después la mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta la temperatura ambiente. Después de 90 min. a temperatura ambiente, la hidrólisis estaba terminada mediante TLC. La mezcla se evaporó a vacío, y el TFA residual se eliminó resolviendo el residuo en acetonitrilo y evaporando la disolución 3 veces. El producto de la reacción se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (5 x 18 cm), eluyendo con un gradiente por etapas de 1 - 2% de agua en acetonitrilo para producir 2,49 g (78%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,72 (s, 3H), 1,78 (s, 3H), 2,75 (t, 2H), 4,12 (m, 2H), 4,60 (s, 2H), 7,13-7,42 (m, 4H), 7,91 (s, 1H), 11,68 (s, 1H).

Compuesto M18.

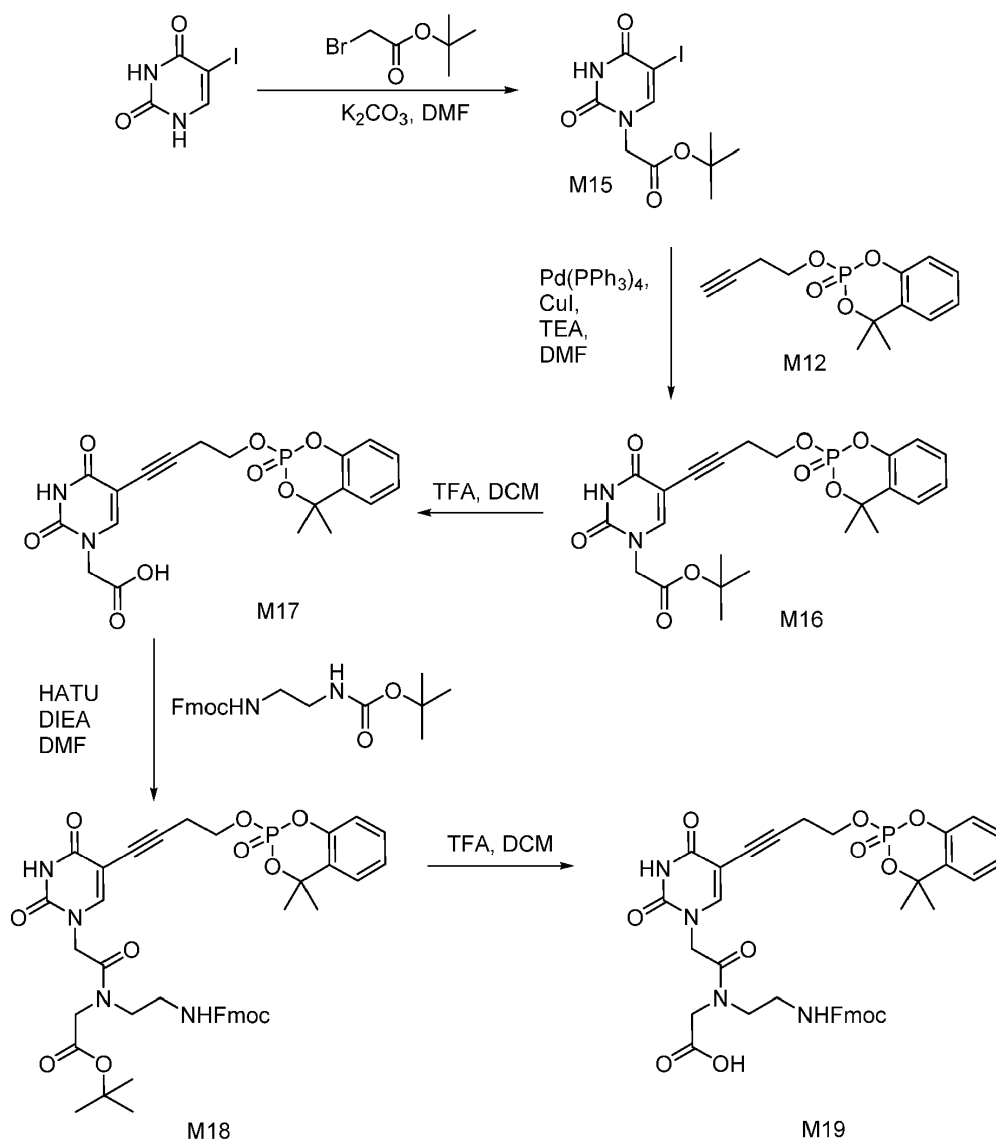


Se disolvieron compuesto M17 (véase anteriormente; 1,53 g, 3,5 mmoles) y Fmoc-Boc-etilendiamina (1,40 g, 3,5 mmoles) en 40 ml de DMF anhidra bajo argón, y la disolución resultante se enfrió hasta 0°C. Se añadió DIEA (1,40 ml, 8 mmoles), seguido de HATU (1,61 g, 3,8 mmoles), y tras agitar a 0°C durante 10 min., la mezcla se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó con HCl 1M (200 ml), agua (2 x 150 ml), y salmuera (150 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta un aceite. El producto de la reacción se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (5 x 18 cm), eluyendo con un gradiente por etapas de 1 - 3% de metanol en diclorometano para producir 2,09 g, (73%) de Compuesto M18. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,41 (s, 9H), 1,71 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 2,69 (m, 2H), 3,05-3,41 (m, 4H), 3,95 (s, 1H), 4,07-4,35 (m, 5H), 4,71 (s, 1H), 7,12-7,43 (m, 8H), 7,66-7,96(m, 5H), 11,69 (s, 1H).

Compuesto M19.



El compuesto M18 (véase anteriormente; 2,07 g, 2,5 mmoles) se disolvió en 20 ml de diclorometano, y la disolución se enfrió hasta 0°C. A la disolución se añadió TFA (20 ml) en porciones durante 10 min.. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. Después de 90 min. a temperatura ambiente, la hidrólisis estaba terminada mediante TLC. La mixture se evaporó a vacío, y el residuo se evaporó con diclorometano y se secó a vacío. El producto de la reacción se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice (3,5 x 18 cm), eluyendo con un gradiente por etapas de 2 - 8% de metanol en diclorometano para producir 1,48 g (77%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,72 (s, 3H), 1,78 (s, 3H), 2,72 (t, 2H), 3,25-3,41 (m, 4H), 4,00 (s, 1H), 4,07-4,35 (m, 5H), 4,73 (s, 1H), 7,13-7,20 (m, 2H), 7,31-7,43 (m, 7H), 7,64-7,74 (m, 3H), 7,88-7,90 (m, 2H), 11,63 (m, 1H), 12,75 (s a, 1H).



Ejemplo 5. Comportamiento de fosoramiditos de T^{BP} en la síntesis de oligómeros

En el Ejemplo 5, oligómeros que contienen un único resto T^{BP} en dos posiciones diferentes (oligómeros T1 y T2) o dos restos T^{BP} en ambas posiciones (oligómero T1-2) se sometieron a HPLC de fase inversa con un gradiente de concentración creciente de acetonitrilo. El cromatograma en la FIG. 1A muestra que cuando los grupos protectores de 5'-fosfato DMT no se han eliminado de las bases modificadas en los oligómeros, los oligómeros eluyeron muy próximos entre sí. Por el contrario, el cromatograma en la FIG. 1B muestra que después de que se eliminaron los grupos DMT, el oligómero con dos restos T^{BP} (T1-2) eluyó más rápidamente que los oligómeros que comprenden un único resto T^{BP} (T1 y T2). Estos resultados ilustran que los restos T^{BP} pueden mejorar significativamente la hidrofiliía, y de este modo la solubilidad acuosa, de los oligómeros de ADN.

Oligómeros que comprenden una o más bases modificadas T^{BP} se sintetizaron en un sintetizador de ADN ABI 394 (Applied Biosystems). Se usaron ciclos de síntesis de fosoramidito de oligos estándar. Los oligómeros polinucleotídicos se analizaron usando HPLC de fase inversa (RP HPLC) en una columna Gemini C18 (4,6 mm X 250 mm, 5 μm, Phenomenex), eluyendo con un gradiente lineal de acetonitrilo/bicarbonato de trietilamonio 0,1 M, pH 7: 16-23% de acetonitrilo a lo largo de 20 min. para oligómeros polinucleotídicos con DMT, y 7-14% de acetonitrilo para oligómeros polinucleotídicos a los que se les han eliminado los grupos DMT (DMT-off). Los oligómeros tuvieron las siguientes secuencias:

T1	TTT AGA C(T ^{BP})T CTT GGA TTT	(SEQ ID NO: 1)
T2	TTT AGA CTT CT(T ^{BP})GGA TTT	(SEQ ID NO: 2)
T1-2	TTT AGA C(T ^{BP})T CT(T ^{BP})GGA TTT	(SEQ ID NO: 3)

El dato de RP HPLC para la mezcla bruta de oligonucleótidos tras la síntesis de oligos se muestra en la FIG. 1A con la incorporación del grupo protector dimetoxitritilo (DMT), y en la FIG. 1B con el grupo protector DMT eliminado mediante tratamiento con ácido acético. Como se puede observar de la FIG. 1B, el oligómero T1-2, que tiene dos restos T^{BP}, es el más hidrófilo de los tres oligómeros separados mediante HPLC.

5 Ejemplo 6. Hibridación de oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden cuatro sustituciones T^{BP}

El Ejemplo 6 describe un experimento en el que se comparó la afinidad de un oligómero de ADN de 18-mero, que comprende cuatro restos T^{BP} (con grupos fosfato desprotegidos), con la afinidad de hibridación de un oligómero de ADN de 18-mero correspondiente que comprende solamente nucleótidos A, C, G y T convencionales, cuando cada uno se hibridó a un oligómero de ADN de 12-mero complementario. Como se muestra mediante las curvas de fusión en la FIG. 2, se observó que el oligómero de 18-mero que comprende cuatro restos T^{BP} de la invención tiene una T_m (temperatura de fusión) alrededor de 10°C mayor que la T_m del 18-mero sin modificar.

La afinidad de unión de hibridación de un oligómero polinucleotídico ilustrativo de la invención que comprende cuatro sustituciones T^{BP} se evaluó usando hebras de ADN complementarias que tienen las siguientes secuencias:

O4 5' TTT AGA C(T^{BP})(T^{BP})C(T^{BP})(T^{BP})GGA TTT-3' (SEQ ID NO: 4)

OC 5'-TCC AAG AAG TCT-3' (SEQ ID NO: 5)

15 En esta dirección 3'→5', OC lee 3'-TCTGAAGAACCT-5' (que muestra la complementariedad a O4).

Con fines comparativos, también se evaluó la hibridación de la hebra no sustituida (ADN normal).

OO 5'-TTT AGA CTT CTT GGA TTT-3' (SEQ ID NO: 6)

En la FIG. 2 se muestran datos de fusión de hibridación, en la que la curva de fusión observada para el oligómero sin sustituir se denomina "sin modificar", y la curva de fusión observada para el oligómero que contiene T^{BP} se designa "T^{BP}". Como se muestra en la FIG. 2, el oligómero que contiene T^{BP} demuestra una afinidad de hibridación superior en comparación con el oligómero sin sustituir. Se observó un desplazamiento de T_m de alrededor de 10°C.

Ejemplo 7. Comportamiento de sondas de PCR de 5' nucleasa

En el Ejemplo 7, se llevaron a cabo reacciones de PCR de 5'-nucleasa usando sondas fluorescentes escindibles que comprenden 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 bases (T^{BP}) modificadas de la descripción. Los perfiles de PCR mostrados en las FIGS. 3A y 3B demuestran que todos los oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden restos T^{BP} se comportaron eficientemente como sondas de detección. Además, los oligómeros polinucleotídicos modificados que comprenden restos T^{BP} tienen una mayor afinidad por secuencias oligoméricas complementarias que la que tienen los oligómeros sin modificar, permitiendo mayores temperaturas de extensión de PCR y tiempos más cortos del ciclo de PCR.

Se evaluó el comportamiento de sondas de PCR de 5' nucleasa que comprenden una a seis bases modificadas T^{BP}. Para consistencia, todas estas sondas contenían un resto FAM en el extremo 5', y un resto inhibidor de la fluorescencia 3'-BHQTM. Como molde de la PCR, se usó una secuencia constitutiva de beta-globulina de ADN genómico humana. La PCR se llevó a cabo en un instrumento Stratagene Mx3005PTM, ensayándose cada reacción por triplicado. Se usaron las siguientes concentraciones de PCR y ciclos de PCR:

longitud del amplicón inicial – 96 pb, 10.000 copias/reacción;

35 concentración de cebadores – 200 nM;

concentración de sonda – 200 nM;

ciclos de PCR (hibridar/extender 30 s a 68°C; desnaturalizar 8 s a 95°C)

Las sondas oligoméricas y de oligómeros polinucleotídicos modificados tuvieron las siguientes secuencias.

Tabla 1

Nombre	5'	Secuencia	3'	SEQ ID
Pf1	FAM	5'-CTC CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	7
Pf1-T-1	FAM	5'-C(T ^{BP})C CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	8
Pf1-T-2	FAM	5'-CTC CG(T ^{BP})GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	9
Pf1-T-3	FAM	5'-CTC CGT GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	10
Pf1-T-4	FAM	5'-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP})GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	11

Pf1-T-5	FAM	5'-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	12
Pf1-T-6	FAM	5'-CTC CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP}) C-3'	BHQ1	13
Pf1-T-7	FAM	5'-C(T ^{BP})C CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP}) C-3'	BHQ1	14
Pf1-T-8	FAM	5'-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP})C-3'	BHQ1	15

En las FIGS. 3A y 3B se muestran los datos de PCR resultantes. Como se demuestra mediante los datos, la presencia de los restos T^{BP} en sondas de PCR de 5' nucleasa es completamente compatible con la PCR. La inclusión de restos T^{BP} en tales sondas aumentó la afinidad de hibridación por una secuencia de bases complementaria cuando se incluyen en cualquier posición o múltiples posiciones en una sonda.

Ejemplo 8. Restos T^{BP} en cebadores de PCR

El Ejemplo 8 describe un experimento en el que se llevaron a cabo reacciones de PCR de 5'-nucleasa usando una sonda fluorescente escindible y diferentes combinaciones por parejas de cebadores directos e inversos que no contienen ningún resto TBP (cebadores P2F y P2R) o que contienen un único resto T^{BP} en una a tres posiciones diferentes (P1F, P1R, y P1-1R). En la FIG. 4 se muestran los perfiles resultantes de PCR. Todos los cebadores que comprenden restos T^{BP} se comportaron eficientemente como sustratos de ADN polimerasa en PCR de 5' nucleasa.

Se evaluaron como cebadores de PCR oligómeros polinucleotídicos modificados que tienen sustituciones de T^{BP}. Se sintetizaron y evaluaron cebadores que tienen una única sustitución de T^{BP} cerca del extremo 3', en el centro, y cerca del extremo 5'. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: concentración de cebadores y sonda 200 nM; amortiguador de PCR, 0,3% de Tween 20; 10.000 copias/reacción de ADN de HG; 60 s a 95°C, seguido de 55 ciclos de PCR (30 s a 60°C, 10 s a 72°C; 8 s a 95°C).

P1F	5'-ATTCCTGAAGCTGACAGCA(T ^{BP})T-3'	(SEQ ID NO: 16)
P1R	5'-AAATAGCC(T ^{BP})CCAGGCA-3'	(SEQ ID NO: 17)
P1-1R	5'-AAA(T ^{BP})AGCCTCCAGG CA-3'	(SEQ ID NO: 18)
P2F	5'-AATTCCTGAAGCTGACAGCA-3'	(SEQ ID NO: 19)
P2R	5'-AAATAGCCTCCAGGCCA-3'	(SEQ ID NO: 20)
Sonda	5'-FAM-CCACGGAGCGAGACA(T ^{BP})C(T ^{BP})CGGC-BHQ1-3'	(SEQ ID NO:21)

Se ensayaron seis mezclas de reacción de PCR con diversas combinaciones de cebadores directos e inversos y las sondas anteriores. Los resultados se representan en la FIG. 4. La FIG. 4 demuestra el comportamiento de los cebadores y sondas modificados con T^{BP} expuestos anteriormente.

Ejemplo 9. Síntesis de oligómeros de PNA modificados que comprenden restos T^{BP}

El Ejemplo 9 proporciona un protocolo sintético mediante el cual se prepararon oligómeros de PNA de 9-mero mediante síntesis de PNA en fase sólida convencional.

La síntesis de los oligómeros de PNA modificados se llevó a cabo manualmente usando resina Fmoc-PAL-PEG-PS (0,16 mmoles/g) de Applied Biosystems. Los monómeros protegidos con Fmoc y el HATU se obtuvieron de PolyOrg, Inc., y los disolventes procedían de EMD. La piperidina, TFA, DIEA, y m-cresol procedían de Aldrich. La resina se hinchó en DCM durante al menos 2 horas antes del uso, y entonces se lavó con DCM (5x) y DMF (5x).

Protocolo sintético:

Desprotección:	piperidina al 20% en DMF, 2 x 5 min.
Lavado:	DMF (5x), DMF/DCM (1:1) (5x)
Preactivación:	HATU (4 eq), DIEA (4,5 eq), monómero de PNA (1 eq), DMF, 3 min.
Acoplamiento:	30 min.
Lavado:	DMF/DCM (1:1) (5x)
Protección de extremos:	5% de Ac2O/5% de DIEA, 10 min.
Lavado:	DMF (5x)

La escisión desde el soporte sólido se llevó a cabo con TFA/m-cresol (9:1) durante 90 minutos a temperatura ambiente, seguido de la precipitación en Et₂O. El sólido se recogió mediante centrifugación, y el lavado con Et₂O/centrifugación se repitió dos veces. Tras la purificación mediante HPLC de fase inversa, los PNAs se caracterizaron mediante espectrometría de masas ESI(+).

5 Ejemplo 10. Síntesis de quimeras de PNA-ADN

El Ejemplo 10 proporciona un método general mediante el cual se pueden obtener mediante métodos conocidos oligómeros de quimeras de PNA-ADN, en los que un monómero de PNA que comprende una base modificada de la descripción se incorpora por medio de un fosforamido de nucleósido o como un monómero de PNA modificado.

10 Los oligómeros de PNA y las quimeras de ADN-PNA se sintetizan vía una estrategia de fase sólida usando monómeros de PNA protegidos con Fmoc y fosforamiditos de nucleósidos, como se da a conocer previamente (Petraccone et al., J. Am. Chem. Soc., 2005, 16125-16223). Resina de Tentagel-OH, funcionalizada con N-Fmoc glicina, se hace reaccionar con la primera unidad de PNA, seguido de la reacción con unidades de 5'-O-DMT-3'-O-(2-cianoetil)fosforamido de guanosina, timidina, adenosina, y citidina, para obtener las quimeras. Las quimeras se desprenden del soporte sólido, y se desprotegen con amoníaco acuoso concentrado a 55°C durante 12-16 h. Las disoluciones se evaporan para eliminar el amoníaco, y los productos se aíslan vía HPLC de fase inversa preparativa.

15 Ejemplo 11. Hibridación de PNA modificado con T^{BP} a ADN

El Ejemplo 11 describe un experimento en el que se determinaron las temperaturas de fusión para oligómeros de PNA que se habían obtenido mediante el protocolo del Ejemplo 9 y que comprendían un resto T^{BP} (PNA-T1 y PNA-T2) o dos restos T^{BP} (PNA-T3) en las posiciones cuarta y/o séptima en cada oligómero. Como se muestra en la 20 Tabla 2 del Ejemplo 11, los tres oligómeros de PNA que contienen T^{BP} tuvieron mayores valores de T_m, y de este modo, mayores afinidades de unión, que el valor de T_m observado para un oligómero de ADN de control, según se mide para un dúplex de hibridación formado con un oligómero de ADN diana complementario. El dato de T_m también muestra que el oligómero de PNA que comprende dos bases modificadas separadas mediante dos monómeros de PNA estándar intermedios parece tener valores de T_m ligeramente menores que los dos oligómeros que comprenden 25 solamente un único resto T^{BP} (pero muy por encima de la T_m del dúplex correspondiente de ADN-ADN). En consecuencia, puede ser útil obtener y evaluar varios constructos oligoméricos para determinar el número y las posiciones de los restos T^{BP} que son los mejores para una aplicación particular.

Se prepararon oligómeros de PNA que tienen uno o dos restos T^{BP}, y se determinaron sus temperaturas de fusión (T_m) para la afinidad de hibridación a un ADN diana complementario, como se resume en la Tabla 2 más abajo. La 30 T_m de un ADN de control sin modificar correspondiente, que tiene la misma secuencia que los oligómeros de PNA, también se determinó cuando se hibridó al ADN diana. Los datos de T_m se obtuvieron usando condiciones de fusión estándar (1 uM para cada oligo, 3 mM de MgCl₂, 15 mM de KCl, 25 mM de HEPES, pH 8). La siguiente Tabla 2 enumera las secuencias oligoméricas y los valores de T_m observados.

Tabla 2

Identificador	Secuencia	T _m , °C	SEQ ID NO:
PNA-T1	5'-CGA(T ^{BP})ACTGC-3'	46,7	22
PNA-T2	5'-CGATAC(T ^{BP})GC-3'	47,8	23
PNA-T3	5'-CGA(T ^{BP})AC(T ^{BP})GC-3'	46,0	24
ADN de control	5'-CGATACTGC-3'	38,4	25
ADN diana	5'-TTTGCAGTATCGTTT-3'		26

35 Como se puede observar a partir de la Tabla 2, los oligómeros de PNA PNA-T1 y PNA-T2 mostraron mayores temperaturas de fusión, y de este modo mayores afinidades de unión por la secuencia complementaria con la hibridación, que las que tuvieron los oligómeros de ADN de control que no contienen restos T^{BP}.

Ejemplo 12. HPLC de oligómeros de PNA modificados con T^{BP}

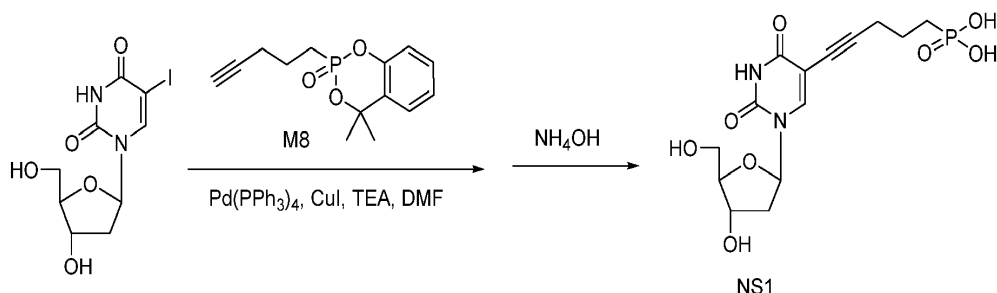
40 El Ejemplo 12 describe un experimento en el que los oligómeros de PNA procedentes del Ejemplo 11 se sometieron a HPLC de fase inversa con un gradiente de concentración creciente de acetonitrilo. El cromatograma en la FIG. 5 muestra que el oligómero de PNA que comprende dos bases modificadas T^{BP} (PNA-T3) eluyó sustancialmente más pronto que los oligómeros que comprenden un único resto T^{BP} (PNA-T1 y PNA-T2), que eluyeron más pronto que el oligómero de PNA sin modificar. Estos resultados ilustran que los restos T^{BP} pueden mejorar significativamente la 45 hidrofilia, y de este modo la solubilidad acuosa de oligómeros de PNA.

Los oligómeros de PNA modificados con T^{BP} procedentes del Ejemplo 11 se analizaron mediante RP HPLC (columna Gemini C18, 4,6 x 25 mm, gradiente lineal de acetonitrilo desde 5% hasta 15% en amortiguador de bicarbonato de TEA (pH 7,5) durante 40 min.). Como se muestra mediante los cromatogramas superpuestos en la FIG. 5, las secuencias de PNA modificado con T^{BP} tuvieron menores tiempos de retención en comparación con el

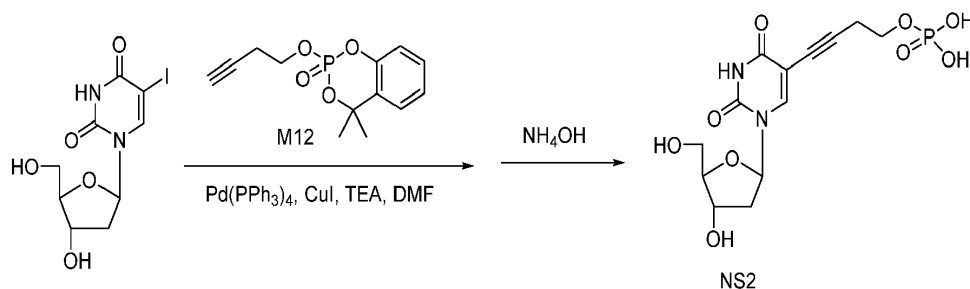
tiempo de retención de PNA sin modificar, lo que demuestra que las modificaciones con T^{BP} incrementan la hidrofilia (y de este modo, la solubilidad acuosa) de los oligómeros de PNA.

Ejemplo 13: Método general para la síntesis de nucleósidos

- 5 El Compuesto NS1 ilustra un nucleósido modificado que comprende una base modificada que comprende un resto de fosfonato. El Compuesto NS1 se prepara de forma análoga al Compuesto M9 (véase anteriormente), partiendo de 5-yodo-2'-desoxiuridina y el Compuesto M8 vía Pd(PPh₃)₄ y acoplamiento catalizado con yoduro de cobre(I), seguido de la eliminación del grupo protector con amoníaco acuoso al 25%.

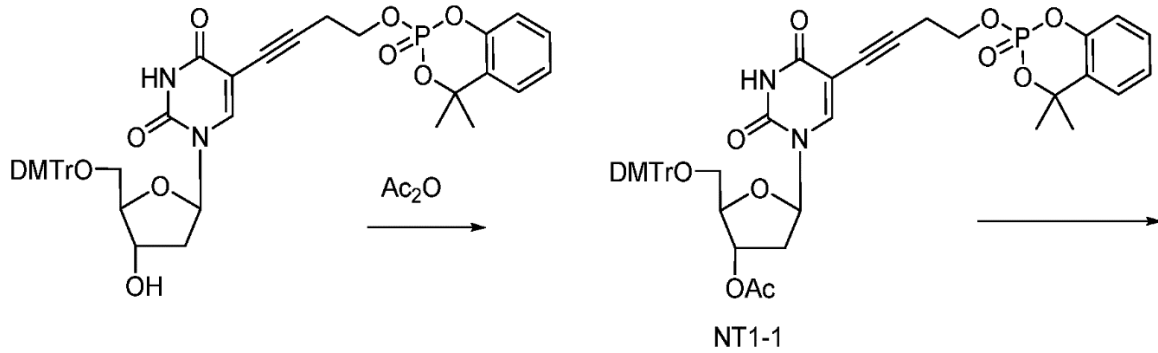


- 10 El Compuesto NS2 ilustra un nucleósido modificado que comprende una base modificada que comprende un resto de fosfato. El Compuesto NS2 se prepara de forma análoga al Compuesto M13 (véase anteriormente), partiendo de 5-yodo-2'-desoxiuridina y el Compuesto M12 (véase anteriormente) vía Pd(PPh₃)₄ y acoplamiento catalizado con yoduro de cobre(I), seguido de la eliminación del grupo protector con amoníaco acuoso al 25%.

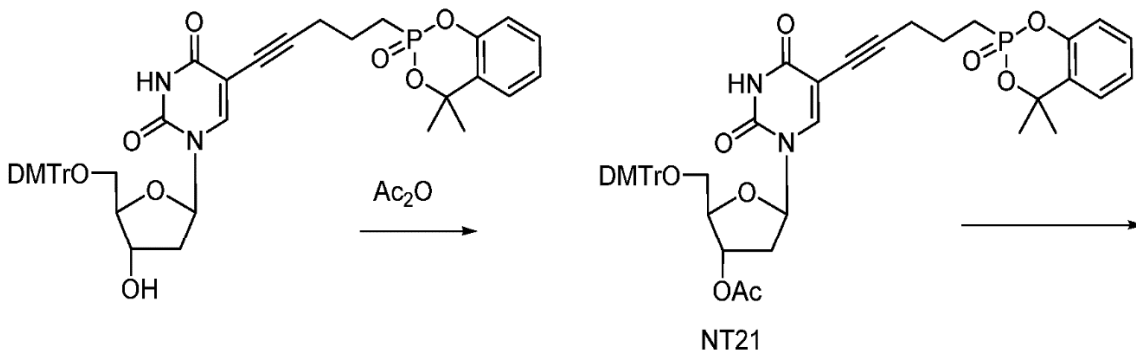
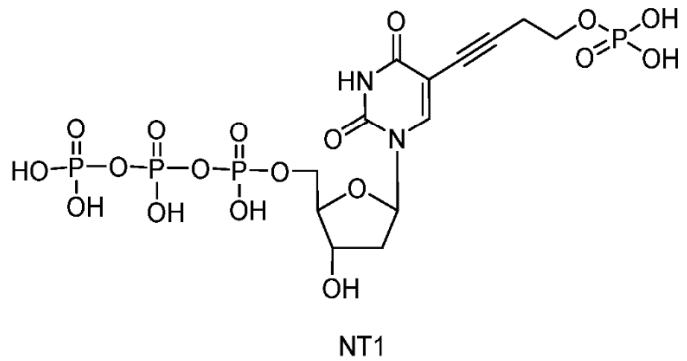


Ejemplo 14: Método general para la síntesis de 5'-trifosfatos de nucleótidos

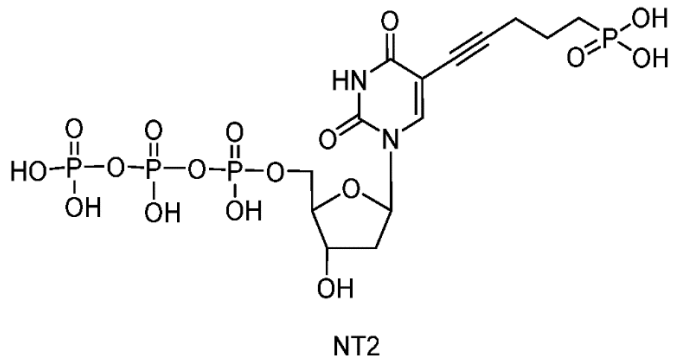
- 15 Los trifosfatos de nucleótidos modificados NT1 y NT2 se sintetizan a partir de los derivados 5'-DMTr correspondientes M13 y M9 (véase anteriormente) mediante acetilación del grupo 3'-hidroxi, seguido de la eliminación del grupo 5'-DMTr y conversión en los trifosfatos correspondientes usando el protocolo descrito por Hollenstein M., "Synthesis of Deoxynucleoside Triphosphates that Include Proline, Urea, or Sulfonamide Groups and Their Polymerase Incorporation into DNA", Chem. Eur. J. 2012, 18, 13320 - 13330).



1. DCAA (1%), CH₂Cl₂
 2. 2-cloro-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona
Py, dioxano
 3. (nBu₃NH)₂H₂P₂O₇, DMF, nBu₃N
-
4. I₂, Py, H₂O
 5. NH₄OH



1. DCAA (1%), CH₂Cl₂
 2. 2-cloro-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona
Py, dioxano
 3. (nBu₃NH)₂H₂P₂O₇, DMF, nBu₃N
-
4. I₂, Py, H₂O
 5. NH₄OH



Ejemplo 15: Lista consolidada de secuencias

La Tabla 3 a continuación proporciona una lista consolidada de secuencias preparadas y usadas aquí como se describe.

5

Tabla 3. Lista consolidada de secuencias

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
1	T1	5'-TTT AGA C(T ^{BP})T CTT GGA TTT-3'
2	T2	5'-TTT AGA CTT CT(T ^{BP}) GGA TTT-3'

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
3	T1-2	5'-TTT AGA C(T ^{BP})T CT(T ^{BP}) GGA TTT-3'
4	O4	5'-TTT AGA C(T ^{BP})(T ^{BP}) C(T ^{BP})(T ^{BP}) GGA TTT-3'
5	OC	5'-TCC AAG AAG TCT-3'
6	OO	5'-TTT AGA CTT CTT GGA TTT-3'
7	Pf1	5'-FAM-CTC CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
8	Pf1-T-1	5'-FAM-C(T ^{BP})C CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
9	Pf1-T-2	5'-FAM-CTC CG(T ^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
10	Pf1-T-3	5'-FAM-CTC CGT GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
11	Pf1-T-4	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
12	Pf1-T-5	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
13	Pf1-T-6	5'-FAM-CTC CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
14	Pf1-T-7	5'-FAM-C(T ^{BP})C CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
15	Pf1-T-8	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP}) GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
16	P1F	5'-ATTCCTGAAGCTGACAGCA(T ^{BP})T-3'
17	P1R	5'-AAATAGCC(T ^{BP})CCAGGCA-3'
18	P1-1R	5'-AAA(T ^{BP})AGCCTCCAGG CA-3'
19	Sonda	5'-FAM-CCACGGAGCGAGACA(T ^{BP})C(T ^{BP})CGGC-BHQ1-3'
20	P2F	5'-AATTCCTGAAGCTGACAGCA-3'
21	P2R	5'-AAATAGCCTCCAGGCCA-3'
22	PNA-T 1	5'-CGA (T ^{BP})AC TGC-3'
23	PNA-T2	5'-CGA TAC (T ^{BP})GC-3'
24	PNA-T3	5'-CGA(T ^{BP})AC(T ^{BP})GC-3'
25	ADN de control	5'-CGA TAC TGC-3'
26	ADN diana	5'-TTT GCA GTA TCG TTT-3'

5 Aunque se proporciona anteriormente una variedad de ejemplos y otra información para explicar aspectos dentro del alcance de las reivindicaciones, no se debería implicar ninguna limitación de las reivindicaciones en base a las características o disposiciones particulares en tales ejemplos, ya que alguien de pericia normal sería capaz de usar estos ejemplos para derivar una amplia variedad de implementaciones. Además, aunque cierta materia objeto puede haberse descrito en lenguaje específico para los ejemplos de características estructurales, condiciones o usos, se ha de entender que la materia objeto definida por las reivindicaciones no está necesariamente limitada así.

Listado de secuencias

<110> Cepheid
<120> MODIFIED THYMINE POLYNUCLEOTIDE OLIGOMERS AND METHODS
<130> R2097-00276
5 <150> 61/972,389
<151> 2014-03-30
<160> 26
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
10 <211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de T1
15 <220>
<221> base modificada
<222> (8)..(8)
<223> resto de TBP
<400> 1
20 ttagacttc ttggattt 8
<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de T2
<220>
<221> base modificada
<222> (12)..(12)
30 <223> resto de TBP
<400> 2
ttagacttc ttggattt 18
<210> 3
<211> 18
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>

- <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia T1-2
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
- 5 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> resto de TBP
- 10 <400> 3
 ttagacttc ttggattt 18
 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
- 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de 04
 <220>
 <221> base modificada
- 20 <222> (8)..(8)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
- 25 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> resto de TBP
- 30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> resto de TBP
 <400> 4
- 35 ttagacttc ttggattt 18
 <210> 5
 <211> 12

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de OC
 5 <400> 5
 tccaagaaat ct 12
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de OO
 <400> 6
 tttagacttc ttggattt 18
 15 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 7
 30 ctccgtggcc ttactgtgc tc 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-1
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 5 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 8
 ctccgtggcc ttagctgtgc tc 22
 <210> 9
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-2
 20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 30 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 9
 ctccgtggcc ttagctgtgc tc 22
 <210> 10
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-3
 <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 10 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 15 <400> 10
 ctccgtggcc ttagctgtgc tc 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-4
 <220>
 <221> base modificada
 25 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 30 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> resto de TBP
 35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)

<223> resto de BHQ1
 <400> 11
 ctccgtggcc tttagctgtgc tc 22
 <210> 12
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-5
 10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 20 <222> (6)..(6)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 25 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 30 <400> 12
 ctccgtggcc tttagctgtgc tc 22
 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-6

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> resto de TBP
 <220>
 10 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (18)..(18)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (21)..(21)
 20 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 25 <400> 13
 ctccgtggcc ttagctgtgc tc 22
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-7
 <220>
 <221> base modificada
 35 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>

<221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> resto de TBP
 <220>

5 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> resto de TBP
 <220>

<221> base modificada
 10 <222> (16)..(16)
 <223> resto de TBP
 <220>

<221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 15 <223> resto de TBP
 <220>

<221> base modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> resto de TBP
 20 <220>

<221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 14

25 ctccgtggcc ttagctgtgc tc 22
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de Pf1-T-8
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 35 <223> resto de FAM
 <220>

<221> base modificada

<222> (2)..(2)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (6)..(6)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 10 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> resto de TBP
 15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> resto de TBP
 <220>
 20 <221> base modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada
 25 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 15
 ctccgtggcc ttactgtgc tc 22
 <210> 16
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de P1F
 35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (20)..(20)

<223> resto de TBP
 <400> 16
 attcctgaag ctgacagcat t 21
 <210> 17
 5 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de P1R
 10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> resto de TBP
 <400> 17
 15 aaatagcctc caggca 16
 <210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de P1-1R
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 25 <223> resto de TBP
 <400> 18
 aaatagcctc caggca 16
 <210> 19
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de sonda
 <220>
 35 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM

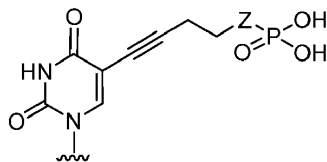
<220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> resto de TBP
 5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> resto de TBP
 <220>
 10 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 19
 ccacggagcg agacatctcg gc 22
 15 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 .<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de P2F
 <400> 20
 aattctgaa gctgacagca 20
 <210> 21
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de P2R
 <220>
 30 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> resto de FAM
 <220>
 <221> base modificada
 35 <222> (17)..(17)
 <223> resto de BHQ1
 <400> 21

aaatagcctc caggcca 17
 <210> 22
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de PNA-T1
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (4)..(4)
 <223> resto de TBP
 <400> 22
 cgatactgc 9
 <210> 23
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de PNA-T2
 20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> resto de TBP
 <400> 23
 25 cgatactgc 9
 <210> 24
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de PNA-T3
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 35 <223> resto de TBP
 <220>
 <221> base modificada

<222> (7)..(7)
<223> resto de TBP
<400> 24
cgatactgc 9
5 <210> 25
<211> 9
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de ADN de control
<400> 25
cgatactgc 9
<210> 26
<211> 15
15 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de ADN diana
<400> 26
20 ttgcagtat cgttt 15

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero polinucleotídico que comprende al menos una base modificada, en el que la al menos una base modificada se representa mediante la fórmula:



5 en la que Z es CH₂ u O.

2. El oligómero polinucleotídico de la reivindicación 1, en el que el oligómero polinucleotídico comprende al menos un resto desoxirribonucleotídico, preferiblemente la base modificada está enlazada covalentemente al resto desoxirribonucleotídico; y/o

10 en el que el oligómero polinucleotídico comprende al menos un resto de ácido nucleico peptídico, preferiblemente la base modificada está enlazada covalentemente al al menos un resto de ácido nucleico peptídico en el oligómero polinucleotídico.

3. El oligómero polinucleotídico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el oligómero polinucleotídico es una quimera de PNA/DNA; y/o

15 en el que el oligómero polinucleotídico comprende al menos dos bases modificadas, y en el que Z en las al menos dos bases modificadas es igual o diferente; y/o

en el que el oligómero polinucleotídico comprende la base modificada en su extremo 3' o en una base a partir de su extremo 3'; y/o

en el que el oligómero polinucleotídico comprende además un ligando de unión al surco menor o un intercalador; y/o

20 en el que el oligómero polinucleotídico comprende además una modificación de azúcar, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en arabinosa, d-arabino-hexitol, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, hexosa, y un azúcar bicíclico.

4. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además una modificación de cadena principal, seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en una cadena principal de fosfato de azúcar modificado, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, una cadena principal peptídica, una cadena principal de fosfotriéster, una cadena principal de fosforamidato, una cadena principal de siloxano, una cadena principal de éster carboximetílico, una cadena principal de acetamidato, una cadena principal de carbamato, una cadena principal de tioéter, una cadena principal de fosfonato de metileno en puente, una cadena principal de fosfortioato, una cadena principal de metilfosfonato, una
30 cadena principal de alquilfosfonato, una cadena principal de éster de fosfato, una cadena principal de alquilfosfonotioato, una cadena principal de fosforoditioato, una cadena principal de carbonato, una cadena principal de triéster de fosfato, una cadena principal de éster carboximetílico, una cadena principal de metilfosfortioato, una cadena principal de fosforoditioato, una cadena principal que tiene enlaces p-etoxi, y una combinación de dos o más de cualquiera de las anteriores.

35 5. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además un nucleótido 3'-terminal que es extensible mediante una enzima polimerasa dependiente de ADN o ARN; y/o

en el que el oligómero polinucleotídico comprises algo menos de 30 nucleótidos, preferiblemente de alrededor de 9 a alrededor de 25 nucleótidos.

40 6. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además un resto seleccionado del grupo que consiste en: un marcador detectable; un fluoróforo; y un inhibidor de la fluorescencia.

7. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además un marcador seleccionado del grupo que consiste en: un cromóforo; un radioisótopo; un marcador de spin; un marcador enzimático; un marcador quimioluminiscente; un compuesto electroquimioluminiscente; un marcador magnético; una microesfera; un metal coloidal; un marcador inmunológico; un ligando; un colorante fluorescente; peroxidasa de rábano picante; fosfatasa alcalina; estreptavidina; biotina; y un epítipo reconocido por un anticuerpo, o

en el que el oligómero polinucleotídico es para uso como una sonda de FRET, y comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en: cumarina; un derivado de cumarina; un colorante de cianina; una eosina; una eritrosina; un quelato macrocíclico de un ion lantánido; un colorante de rodamina; y un colorante de transferencia de energía fluorescente.

5 8. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que, cuando se escribe en su dirección 5' a 3', la al menos una base modificada está en una posición seleccionada del grupo que consiste en: posición 1 del oligómero polinucleotídico; posición 2 del oligómero polinucleotídico; posición 3 del oligómero polinucleotídico; posición 4 del oligómero polinucleotídico; posición 5 del oligómero polinucleotídico; posición 6 del oligómero polinucleotídico; posición 7 del oligómero polinucleotídico; posición 8 del oligómero polinucleotídico; posición 9 del oligómero polinucleotídico; posición 10 del oligómero polinucleotídico; posición 11 del oligómero polinucleotídico; posición 12 del oligómero polinucleotídico; posición 13 del oligómero polinucleotídico; posición 14 del oligómero polinucleotídico; posición 15 del oligómero polinucleotídico; posición 16 del oligómero polinucleotídico; posición 17 del oligómero polinucleotídico; posición 18 del oligómero polinucleotídico; posición 19 del oligómero polinucleotídico; y posición 20 del oligómero polinucleotídico.

15 9. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el oligómero polinucleotídico está unido a un soporte sólido, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en una perla, una matriz, y una micromatriz.

10. El oligómero polinucleotídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además uno o más nucleótidos que tienen unido un resto de azúcar modificado, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en un azúcar 2'-sustituido, un azúcar de 2'-O-alkil-ribosa, un azúcar de 2'-amino-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-desoxirribosa, un azúcar de 2'-fluoro-arabinosa, un azúcar de 2'-O-metoxietil-ribosa, y un azúcar de ácido nucleico bloqueado; y/o

25 en el que el oligómero polinucleotídico comprende además una o más bases no estándar, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida, una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida, una purina modificada, una pirimidina modificada, y una pirimidina 5-sustituida, y/o

en el que el oligómero polinucleotídico comprende además uno o más grupos colgantes, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en un grupo lipófilo, un ligando de unión al surco menor, un intercalador, un agente quelante, y un agente de reticulación.

30 11. El oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el oligómero polinucleotídico comprende además un resto de cola unido bien al extremo 3', al extremo 5, o a ambos extremos del oligómero polinucleotídico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un fosfato, un éster de fosfato, un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, y un grupo lipófilo.

35 12. Un método para hibridar un oligómero polinucleotídico que comprende una base modificada con una secuencia diana de ácido nucleico sospechosa de estar presente en una mezcla de reacción, comprendiendo el método las etapas de:

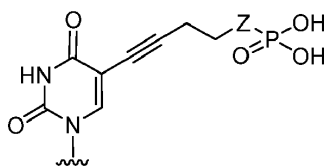
(a) incubar una mezcla de reacción que comprende un oligómero polinucleotídico y que se sospecha que comprende una secuencia diana de ácido nucleico, en condiciones favorables para la hibridación del oligómero polinucleotídico a la secuencia de ácido nucleico diana si está presente en la mezcla de reacción; y

40 (b) detectar la presencia o confirmar la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la mezcla de reacción;

en el que el oligómero polinucleotídico es complementario a una secuencia en la secuencia diana de ácido nucleico,

en el que el oligómero polinucleotídico comprende al menos una base modificada, y

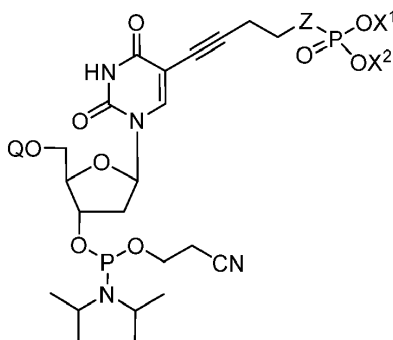
en el que la al menos una base modificada está representada por la fórmula:



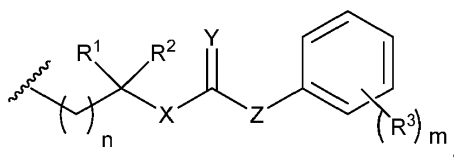
45 en la que Z es CH₂ u O.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el polinucleótido es un oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

14. El método de la reivindicación 12 o reivindicación 13, que comprende además la etapa de llevar a cabo una reacción de amplificación, preferiblemente la reacción de amplificación se selecciona del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR múltiplex, PCR cuantitativa, amplificación a base de secuencia de ácido nucleico, amplificación mediada por transcripción, reacción en cadena de la ligasa, amplificación de círculo rodante, y amplificación por desplazamiento de hebra; y/o
- 5 en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo en un ciclador térmico automatizado.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además la etapa de llevar a cabo una reacción de secuenciación de ADN.
- 10 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además la etapa de llevar a cabo una reacción de extensión del cebador.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que comprende además la etapa de unir el oligómero polinucleotídico a una matriz, seleccionándose preferiblemente la matriz del grupo que consiste en una matriz de chip, una matriz de plataforma, una matriz de perla, una matriz de fase líquida, y una matriz de código postal; y/o
- 15 en el que la matriz comprende nitrocelulosa, vidrio, una oblea de silicio, o una fibra óptica.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, que comprende además la etapa de llevar a cabo una reacción de 5'-nucleasa.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que la etapa de detección comprende detectar un maracador detectable, un fluoróforo o un inhibidor de la fluorescencia unido al oligómero polinucleotídico.
20. Un dúplex que comprende:
- (i) al menos un oligómero polinucleotídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
- (ii) una secuencia polinucleotídica,
- 25 en el que el al menos un oligómero polinucleotídico comprende cuatro o más bases contiguas que son complementarias con y que se hibridan a al menos cuatro bases contiguas de la secuencia polinucleotídica.
21. Un fosforamidito nucleosídico modificado representado por la fórmula:



- en la que Z es CH₂ u O;
- 30 en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores que son iguales o diferentes, o X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado; y
- en la que Q es un grupo protector de hidroxilo.
22. El fosforamidito nucleosídico modificado de la reivindicación 21,
- en el que Z es O; y/o
- 35 en el que Q es tritilo, metoxitritilo, o dimetoxitritilo;
- en el que el grupo protector bidentado es o-bencileno, α-metil-o-bencileno, o α,α-dimetil-o-bencileno; y/o
- en el que X¹ and X², independientemente, tienen una estructura representada por la fórmula:



en la que R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenido de C₂-C₆, alquinilo de C₂-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, o fenilo;

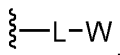
n y m son independientemente 0, 1, 2, 3 o 4; X es O o NR⁴;

5 Y es O o S;

Z es un enlace, O o NR⁴; y

cada R³ es igual o diferente, y es, independientemente, alquilo de C₁-C₆, alquenido de C₂-C₆, alquinilo de C₂-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, ciano, nitro, halógeno, alquil C₁-C₆-oxi, cicloalquil C₃-C₆-oxi, NR^{5a}R^{5b}, o fenilo; en los que R⁴, R^{5a} y R^{5b} son, cada uno independientemente, cicloalquilo de C₃-C₆, o fenilo.

10 23. El fosforamidito nucleosídico modificado de la reivindicación 21, en el que X¹ y X² tienen independientemente la estructura:

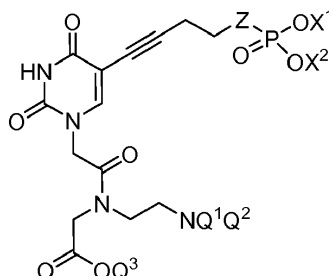


en la que L es un enlace, alquileo de C₁-C₈ o heteroalquileo de C₂-C₈, alquilenilo de C₂-C₈; y

15 W es H, ciano, C(O)NR^aR^b, NO₂, N⁺R^aR^b R^c, C₆H₄NO₂, C₆H₄Cl, C₆H₃(NO₂)₂, C₆H₂(NO₂)₃, SO₂R^c, o S(O)₂OR^c; R^a y R^b son, independientemente, H, CF₃, alquilo de C₁-C₈ o arilo de C₆-C₁₀; y R^c es alquilo de C₁-C₈ o arilo de C₆-C₁₀.

preferiblemente, X¹ y X² son, cada uno por separado, grupos pivaloiloxibencílicos.

24. Un monómero de ácido nucleico peptídico modificado representado por la fórmula:



20 en la que Z es CH₂ u O;

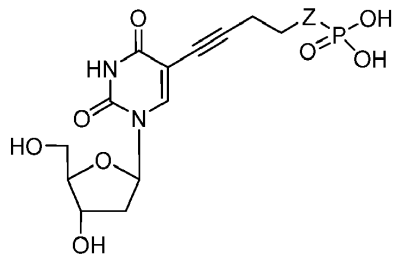
en la que X¹ y X², tomados separadamente, son grupos protectores que son iguales o diferentes, o X¹ y X², tomados juntos, son un grupo protector bidentado;

en la que Q¹ y Q² son independientemente H o un grupo protector de nitrógeno, o Q¹ y Q², juntos, son un grupo protector de nitrógeno; y

25 en la que Q³ es H o un grupo protector de carboxilo.

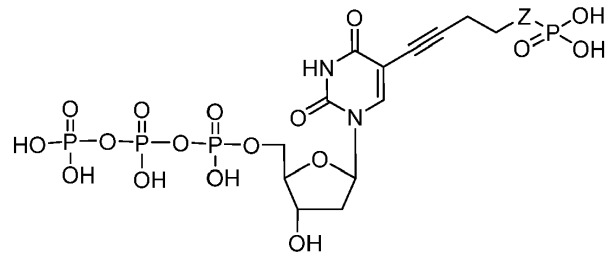
25. El monómero de ácido nucleico peptídico modificado de la reivindicación 24, en el que Q¹ es H, Q² es Fmoc, y Q³ es H.

26. Un nucleósido de timidina modificado, representado mediante la fórmula:



en la que Z es CH₂ u O.

27. Un 5'-trifosfato de nucleótido de timidina modificado, representado mediante la fórmula:



5 en la que Z es CH₂ u O.

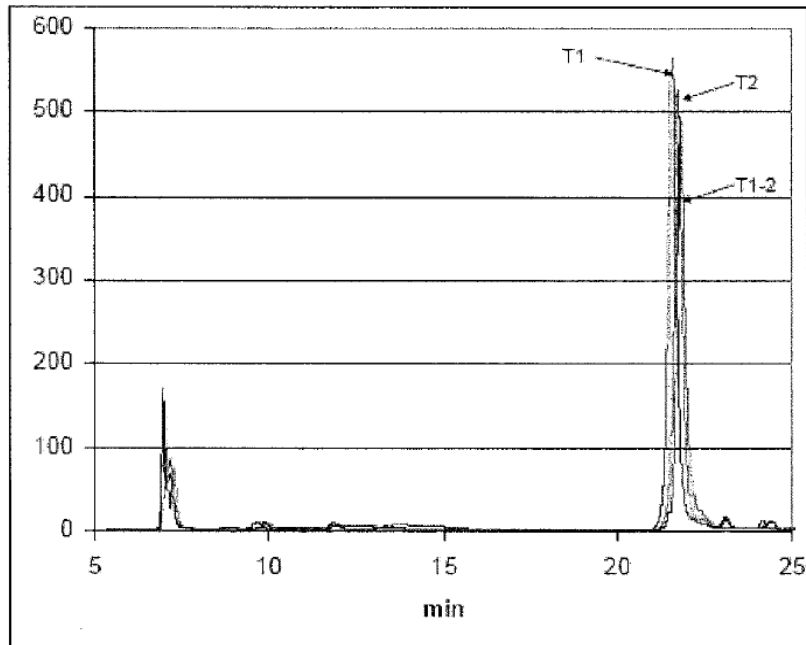


FIG. 1A

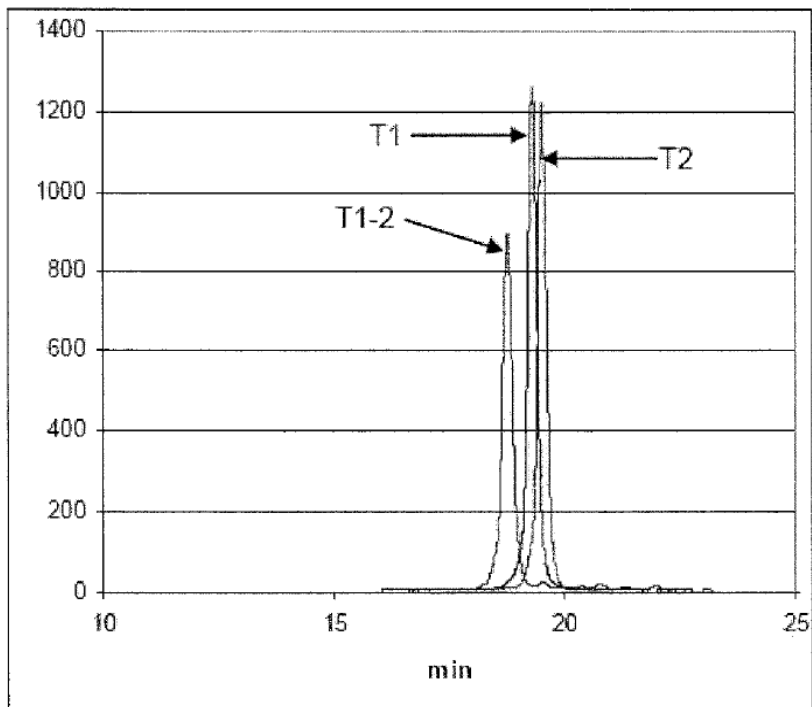


FIG. 1B

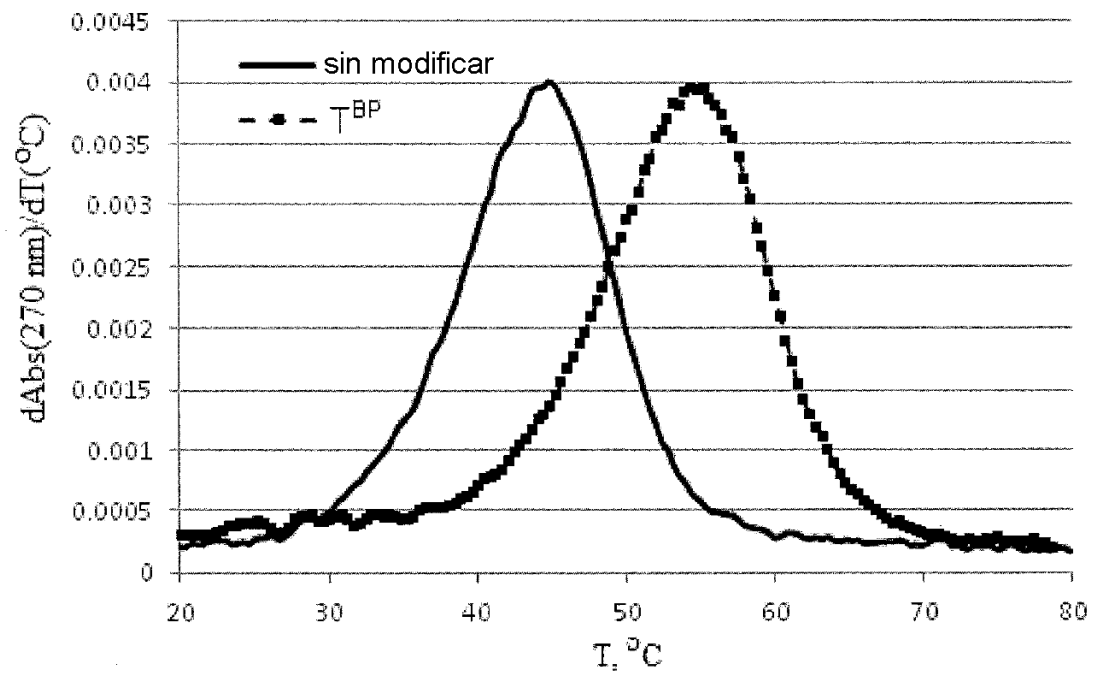


FIG. 2

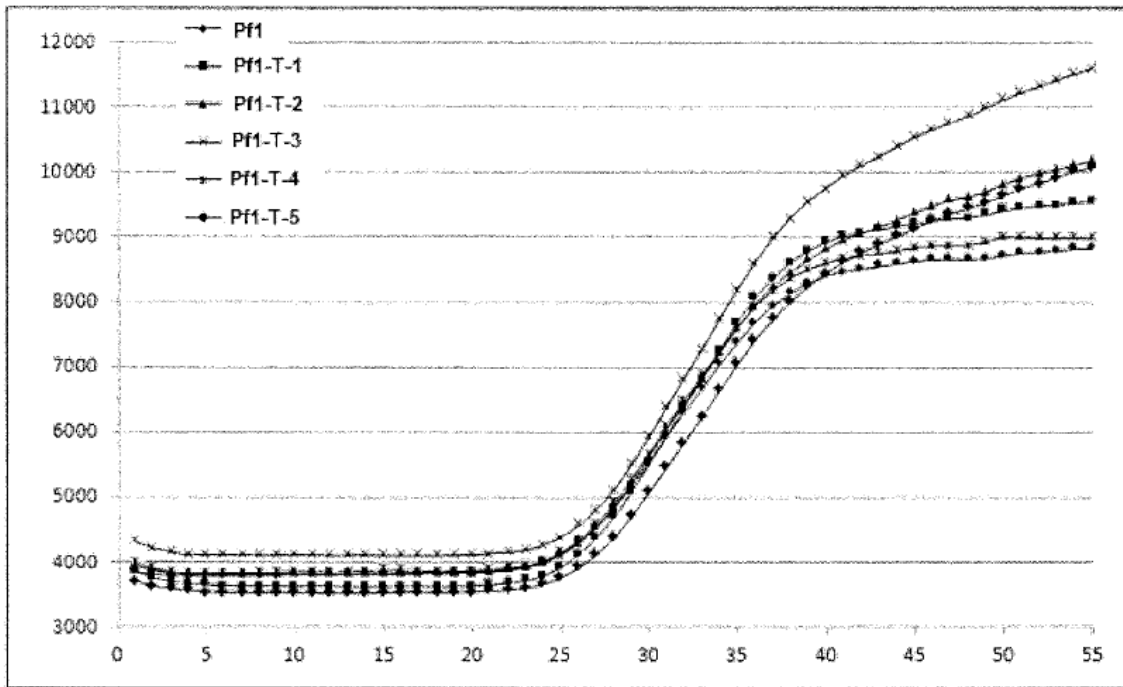


FIG. 3A

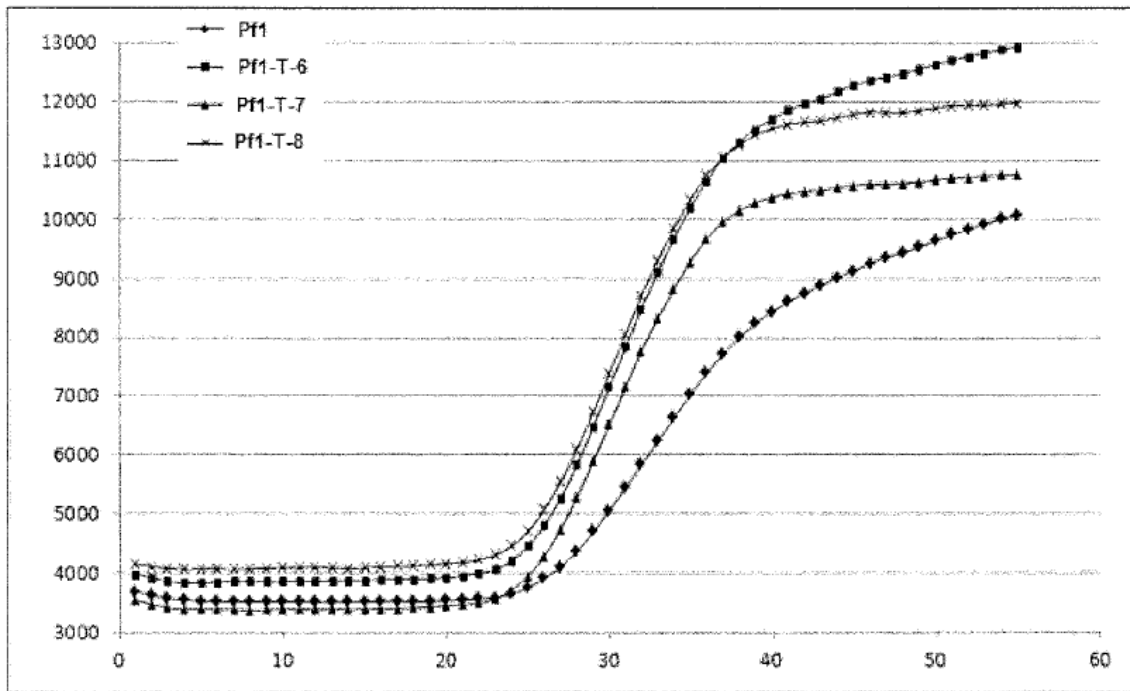


FIG. 3B

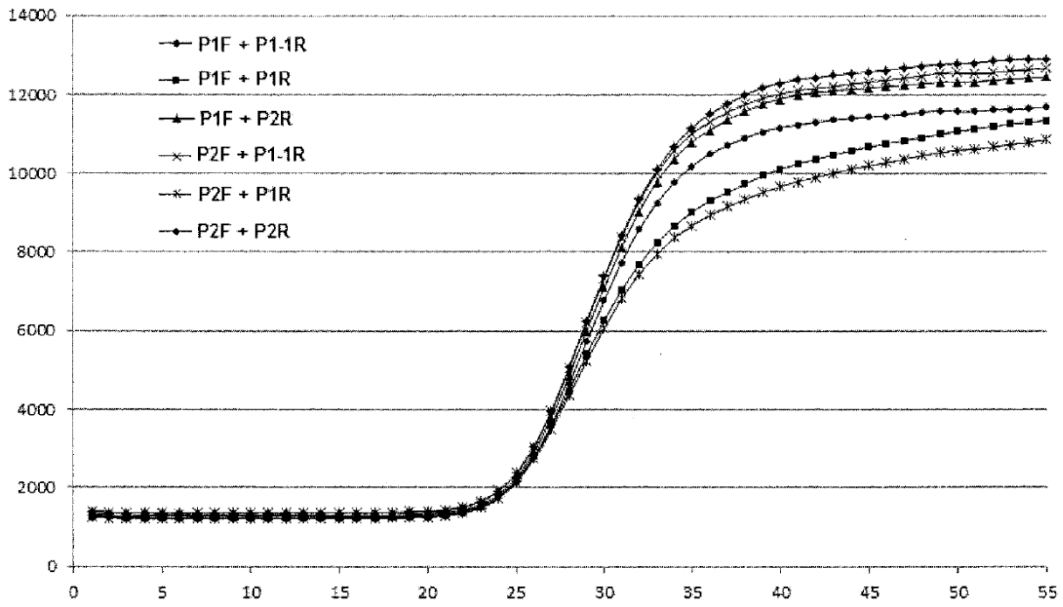


FIG. 4

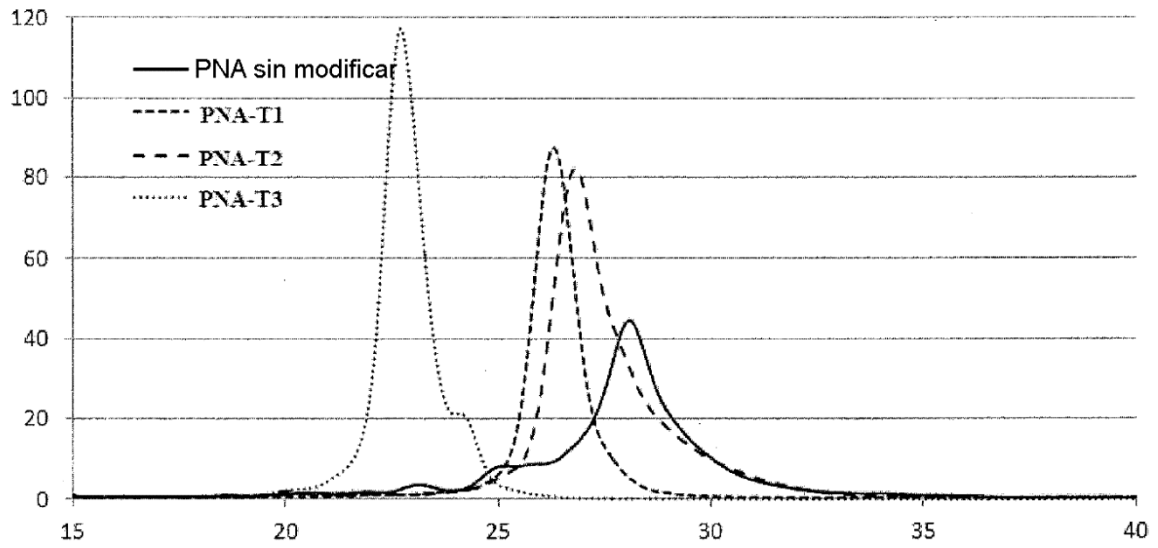


FIG. 5