

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 894**

51 Int. Cl.:

C07C 229/12 (2006.01)

C07C 229/24 (2006.01)

C07D 207/16 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/US2012/041688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170908**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12727204 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2718260**

54 Título: **Diseño y desarrollo de nuevos detergentes para su uso en sistemas de PCR**

30 Prioridad:

08.06.2011 US 201161494812 P

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

05.12.2018

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**ANGRISH, PARUL;
YANG, ZHIWEI y
WANG, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 692 894 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

Diseño y desarrollo de nuevos detergentes para su uso en sistemas de PCR

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/494.812, presentada el 8 de junio de, 2011, titulada "Diseño y desarrollo de nuevos detergentes para uso en sistemas de PCR".

10

Campo

Esta divulgación se refiere a detergentes modificados para su uso en diversos procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se describen métodos para preparar los detergentes modificados.

15

Antecedentes

Muchas técnicas de ADN recombinante ampliamente conocidas implican replicar o polimerizar y/o amplificar ADN. Un ejemplo de ello es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la PCR, la reacción se repite repetidamente entre dos temperaturas, una temperatura baja y una temperatura alta (por ejemplo, 55 °C y 95 °C) en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. El período total de tiempo transcurrido a la temperatura alta durante el curso de la reacción depende del número total de ciclos, la duración de la etapa de temperatura alta de cada ciclo y la velocidad de rampa (es decir, la velocidad a la que el termociclador cambia de una temperatura a otra). Aunque las ADN polimerasas utilizadas en la PCR son altamente termoestables, tienden a volverse inactivas a altas temperaturas con el tiempo. Además, estas polimerasas también pueden volverse inactivas al ser introducidas en ambientes de mezcla de reacción con una concentración subóptima de cofactores, o que tienen niveles de pH subóptimos, o que incluyen la presencia de inhibidores químicos o biológicos.

20

25

Una forma de estabilizar una enzima en tales condiciones es añadir un agente estabilizante, como un tensioactivo. Los tensioactivos, como los detergentes, son compuestos de superficie activa que estabilizan la interfaz entre la forma activa de una enzima y su entorno líquido. Por ejemplo, la actividad de la ADN polimerasa Taq se ha estabilizado mediante la adición de detergentes no iónicos, tal como NP-40 o Tween® 20 (Bachmann, et al. Nuc. Acids Res. 18 (5): 1309 (1990)). Sin embargo, en algunas aplicaciones, las ADN polimerasas estabilizadas con Tween® 20 tienen bajas eficiencias de amplificación o conducen a la amplificación de productos no específicos. Además, algunos detergentes requieren altas concentraciones. Además, también se sabe que algunos detergentes (por ejemplo, NP-40) tienen propiedades tóxicas. Por lo tanto, existe la necesidad de detergentes que mejoren la estabilidad de las ADN polimerasas termoestables en solución, y, particularmente, detergentes que mejoren la estabilidad de la enzima sin impartir ninguna de las desventajas de los detergentes utilizados actualmente.

30

35

40

El documento WO 2008/033936 desvela detergentes no iónicos que son útiles en métodos relacionados con reacciones en cadena de la polimerasa.

Breve descripción de los dibujos

45

Todas las gráficas de amplificación mostradas en el presente documento representan gráficamente la amplificación del ácido nucleico objetivo como ΔR_n (eje y) como una función del número de ciclo (eje x).

Figura 1. La titulación de los nuevos detergentes Dt1 y Dt2 a diferentes concentraciones utilizando productos de PCR de 1 Kb y 3 Kb amplificados de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

50

Figura 2. Amplificación del gen de la rodopsina en presencia de nuevos detergentes Dt1 y Dt2 de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

55

Figura 3. Comparación del nuevo detergente Dt2 al 0,004 % con el 0,0002 % en comparación con NP-40/Tween® 20 para productos de PCR de 0,1 a 1 Kb amplificados de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

60

Figura 4. Comparación de nuevos detergentes Dt2 y 0,004 % y 0,002 % a NP-40/Tween® 20 para productos de PCR de 1 a 2 Kb amplificados de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

65

Figura 5. Actividad de PCR: Comparación del nuevo detergente Dt2 con Brij-58 solo para productos génicos de rodopsina amplificados de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Figura 6. Valoración de los nuevos detergentes Dt2 y Dt4 utilizando la secuencia diana Rhod-1043 amplificada de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

5 **Figura 7.** Comparación de Dt4 con Tween® 20: amplificación de beta-2 microglobulina (B2M), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína ribosómica grande (RPLPO) y glucuronidasa beta (GUSB) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

10 **Figura 8.** Comparación de Dt4 con Tween® 20 (escala logarítmica): amplificación de B2M, GAPDH, RPLPO y GUSB de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

15 **Figura 9.** Comparación de Dt4 con Tween 20: eficacia de la amplificación de diversos productos de PCR como se representa por Cq de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Figura 10. Comparación de Dt1, Dt3, Dt5, Dt6 y Dt7 y Tween® 20; amplificación realizada de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

20 **Figura 11.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT1) comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween 20 (0,001 % y 0,0008 % de cada uno) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

25 **Figura 12.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de HPRT1 que comparan la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0006 % y 0,0004 % de cada uno) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

30 **Figura 13.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de la peptidil proil isomerasa A (PPIA) comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,001 % y 0,0008 % de cada uno) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

35 **Figura 14.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de PPIA que comparan la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0006 % y 0,0004 % de cada uno) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Figura 15. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de PPIA que comparan la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0002% y 0,0001% de cada uno) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

40 **Figura 16.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de B2M que comparan la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween® 20 de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

45 **Figura 17.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de GAPDH que comparan la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween 20 de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

50 **Figura 18.** Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de RPLPO que comparan la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween® 20 de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

55 **Figura 19.** Representación gráfica de las reacciones de amplificación (Cq) tomadas a intervalos de aproximadamente una semana durante dos meses que demuestran la estabilidad de la polimerasa en un tampón 5X (reacciones de amplificación de ACTB (actina-beta), GAPDH, PPIA y RPLPO) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

60 **Figura 20.** Representación gráfica de las reacciones de amplificación (delta Rn) tomadas a intervalos de aproximadamente una semana durante dos meses que demuestran la estabilidad de la polimerasa en un tampón 5X (reacciones de amplificación de ACTB (actina-beta), GAPDH, PPIA y RPLPO) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

65 **Figura 21.** Comparación de dos lotes de Dt4 diferentes con Tween® 20 (Cq, reacciones de amplificación de RPLPO, ACTB, PPIA, GAPDH, PGK1 (fosfoglicerato quinasa 1), B2M, GUSB y HPRT1) Representación gráfica de las reacciones de amplificación (Cq) tomadas aproximadamente a intervalos de una semana durante dos meses que demuestran la estabilidad de la polimerasa en un tampón 5X (reacciones de amplificación de ACTB (actina-beta), GAPDH, PPIA y RPLPO) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones

desvelados en el presente documento.

Figura 22. Comparación de dos lotes de Dt4 diferentes con Tween® 20 (Delta Rn, reacciones de amplificación de RPLPO, ACTB, PPIA, GAPDH, PGK1 (fosfoglicerato quinasa 1), B2M, GUSB y HPRT1) Representación gráfica de las reacciones de amplificación (Cq) tomadas a intervalos de aproximadamente una semana durante dos meses que demuestran la estabilidad de la polimerasa en un tampón 5X (reacciones de amplificación de ACTB (actina-beta), GAPDH, PPIA y RPLPO) de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

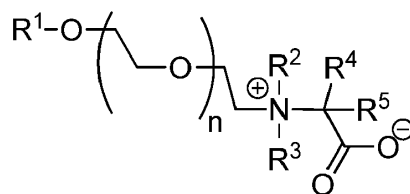
Figura 23. Comparación de la amplificación de Dt4 a través de diversos ensayos TaqMan®, de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Sumario

15 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan detergentes modificados para diversos usos, incluyendo, entre otros, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Los detergentes iónicos y zwitteriónicos se sintetizan modificando químicamente los materiales de partida simples que se proporcionan. Todos los compuestos intermedios se observaron y analizaron mediante análisis LC-MS y luego se usaron sin purificaciones. En algunas realizaciones, se proporcionan nuevos detergentes, tales como Dt4 (descritos a continuación). Estos nuevos detergentes se pueden usar en diversos procedimientos, incluyendo, por ejemplo, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 Los detergentes modificados pueden tener la siguiente fórmula estructural:



Fórmula I

30 en la que:

R¹ es H, alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, en los que el arilo sustituido o el fenilo sustituido están sustituidos con al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀) o heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido;

R² y R³ son cada uno independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂(C₆H₅) o C(CH₃)₃;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, C₆H₅, CH₂(C₆H₅), C(CH₃)₃, CH₂CH(CH₃)₂, CHCH₂CH(CH₃)₂, CH₂C₆H₅OH, CH₂C=CH NH(C₆H₅), CH₂C=CHN=CHNH, CH₂COOH, CH₂CONH₂, (CH₂)₂CONH₂, (CH₂)₂COOH, CH₂SH, (CH₂)_nNH, (CH₂)_nN, CH₂OH, CH(OH)CH₃, (CH₂)₂SCH₃, (CH₂)₃NHC(NH₂)=NH, o, como alternativa, R⁴ se toma junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros que está sustituido opcionalmente con al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido;

y,

cada n es independientemente cualquier número entero positivo, incluidos, entre otros, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

R¹ puede ser un alquilo C₈. R¹ puede ser un alquilo C₁₆. R² y R³ se seleccionan independientemente entre H y CH₃. R⁴ y R⁵ pueden seleccionarse cada uno independientemente entre H, (CH₂)_nNH, (CH₂)_nN, o, como alternativa, R⁴ puede tomarse junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros.

También se proporcionan los métodos para polimerizar y/o amplificar un ácido nucleico que comprende mezclar un ácido nucleico diana con al menos una polimerasa, un cebador, dNTP y al menos un detergente nuevo de Fórmula I, y polimerizar y/o amplificar el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de tales métodos, se utiliza al menos un cebador. En ciertas realizaciones, se proporciona una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende al menos una polimerasa, dNTP, al menos un cebador y al menos un detergente nuevo de Fórmula I. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen además una o más etapas para detectar el marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico mediante la inclusión de un nuevo detergente de Fórmula I. En

- ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos un detergente novedoso de Fórmula I y combinarla para formar una mezcla en condiciones tales que se proporcione la actividad polimerasa de la enzima. En ciertas realizaciones, la polimerasa es termoestable. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan reacciones de amplificación con una eficiencia de amplificación similar a (por ejemplo, aproximadamente la misma), o mayor eficiencia de amplificación cuando se encuentra en presencia de un detergente convencional (por ejemplo, conocido) como, por ejemplo, NP-40 y/o Tween® 20. En ciertas realizaciones, los nuevos detergentes descritos en el presente documento pueden sustituir a NP-40 y/o Tween 20 en una reacción de amplificación.
- En ciertas realizaciones, la concentración efectiva del al menos un detergente nuevo descrito en el presente documento en una mezcla de reacción es menor que la requerida de los detergentes convencionales, tales como NP-40 y/o Tween® 20. En algunas de estas realizaciones, la concentración efectiva de al menos uno o más detergentes nuevos en una mezcla de reacción puede ser de hasta aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces menos que lo requerido por los detergentes convencionales como NP-40 y/o Tween® 20. También se proporcionan métodos para producir los nuevos detergentes.

Las composiciones que comprenden al menos uno de los nuevos detergentes de Fórmula I se proporcionan en el presente documento. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los nuevos detergentes de Fórmula I. En algunas realizaciones, la polimerasa es termoestable. También se proporcionan kits que contienen reactivos y similares necesarios para llevar a cabo tales métodos o preparar tales mezclas.

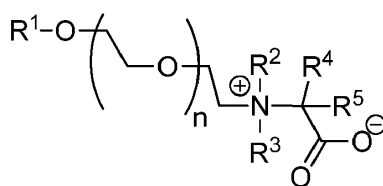
Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan nuevos detergentes para diversos usos, incluidos, entre otros, reacciones de polimerización y/o amplificación de ácidos nucleicos. Los detergentes iónicos y zwitteriónicos pueden sintetizarse químicamente utilizando materiales de partida más simples. Se proporcionan detergentes como Dt1, Dt2, Dt3, Dt4, Dt5, Dt6, Dt7, Dt8, Dt9 y Dt10 (descritos más adelante). Estos nuevos detergentes se pueden usar en diversos procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacciones de polimerización y/o amplificación de ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En algunas realizaciones, la presencia de uno o más de los nuevos detergentes de Fórmula I puede estabilizar la polimerasa dentro de una mezcla de reacción, disminuir la inhibición de la polimerasa dentro de una mezcla de reacción y/o aumentar la polimerización y/o la eficiencia de amplificación de la polimerasa. Como tales, se proporcionan mezclas de reacción que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los nuevos detergentes de Fórmula I. Dichas mezclas de reacción pueden comprender además uno o más dNTP y al menos un cebador de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, cebador de PCR).

Las composiciones que comprenden al menos uno de los nuevos detergentes de Fórmula I se proporcionan en el presente documento. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los nuevos detergentes de Fórmula I. En algunas realizaciones, la polimerasa es termoestable. También se proporcionan kits que comprenden los componentes de dichas mezclas de reacción y, opcionalmente, otros reactivos necesarios para llevar a cabo tales métodos o para preparar tales mezclas.

Los nuevos detergentes y los métodos de preparación y uso de los mismos se describen en el presente documento. La expresión "detergente nuevo" se refiere normalmente a un detergente de Fórmula I. En ciertas realizaciones, el término "detergente" puede referirse a uno o más detergentes nuevos, incluyendo, opcionalmente uno o más "detergentes convencionales". Como se usa en el presente documento, la expresión "detergente convencional" se refiere a un detergente distinto de los descritos en el presente documento con la Fórmula I. En algunas realizaciones, el término "detergente" puede referirse solo a un nuevo detergente, o una combinación de uno o más nuevos detergentes con uno o más detergentes convencionales. De forma similar, el uso de la expresión "al menos un detergente nuevo" puede referirse a uno o más detergentes nuevos solos, con otro detergente nuevo y/o con uno o más detergentes convencionales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones y/o mezclas de reacción descritas en el presente documento pueden comprender además uno o más detergentes convencionales, tales como, por ejemplo y sin limitación, un detergente no iónico, Brij-58, CHAPS, n-Dodecil-b-D-maltósido, NP-40, dodecilsulfato sódico (SDS), TRITON® X-15, TRITON® X-35, TRITON® X-45, TRITON® X-100, TRITON® X-102, TRITON® X-114, TRITON® X-165, TRITON® X-305, TRITON® X-405, TRITON® X-705, Tween® 20 y/o ZWITTERGENT®. Otros detergentes también pueden ser adecuados, según lo determine un experto en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0145910; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0064071; la patente de Estados Unidos N.º 6.242.235; la patente de Estados Unidos N.º 5.871.975; y la patente de Estados Unidos N.º 6.127.155 para detergentes a modo de ejemplo) También pueden ser adecuados detergentes adicionales, según lo determine el experto en la materia.

Los nuevos detergentes pueden tener la siguiente fórmula estructural:



Fórmula I

en la que:

5 R¹ es H, alquilo (C¹-C₃₀), alquilo (C¹-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C¹-C₃₀), heteroalquilo (C¹-C₃₀) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, en el que el arilo sustituido o fenilo sustituido está sustituido con al menos un alquilo (C¹-C₃₀), alquilo (C¹-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C¹-C₃₀) o heteroalquilo sustituido (C¹-C₃₀);

10 R² y R³ son cada uno independientemente H, CH₃, CH (CH₃)₂, CH₂(C₆H₅) o C (CH₃)₃;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, CH₃, CH (CH₃)₂, C₆H₅, CH₂(C₆H₅), C(CH₃)₃, CH₂CH(CH₃)₂, CHCH₂CH(CH₃)₂, CH₂C₆H₅OH, CH+C = CH NH(C₆H₅), CH₂C = CHN = CHNH, CH₂COOH, CH₂CONH₂, (CH₂)₂CONH₂, (CH₂)₂COOH, CH₂SH, (CH₂)_nH, (CH₂)_nN, CH₂OH, CH (OH)CH₃, (CH₂)₂SCH₃, (CH₂)₃NHC(NH₂) = NH, o, como alternativa, R₄ se toma junto con R₅ para formar un anillo de 5 o 6 miembros que está opcionalmente sustituido con al menos un alquilo(C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo C₁-C₃₀, heteroalquilo sustituido (C₁-C₃₀);

y,

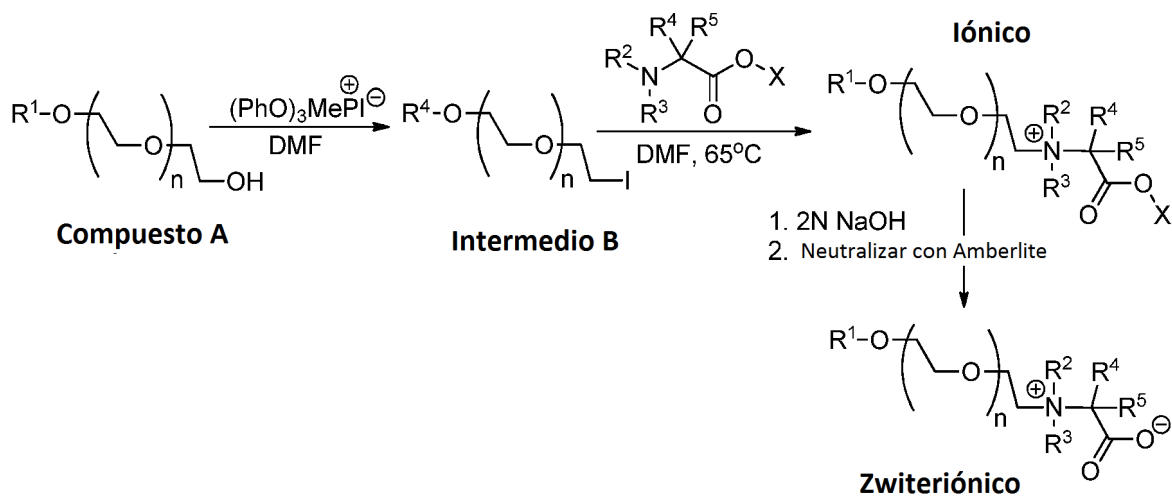
20 cada n es independientemente cualquier número entero positivo, incluidos, entre otros, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

R¹ puede ser un alquilo C₈. R¹ puede ser un alquilo C₁₆. R² y R³ se pueden seleccionar independientemente entre H y CH₃. R⁴ y R⁵ pueden seleccionarse cada uno independientemente entre H, (CH₂)_nNH, (CH₂)_nN, o, como alternativa, R⁴ puede tomarse junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros.

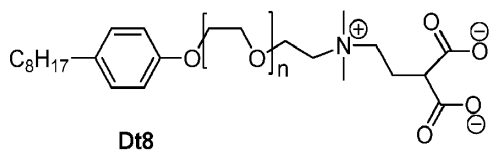
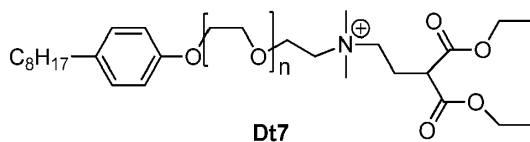
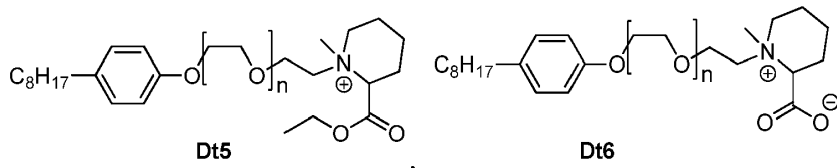
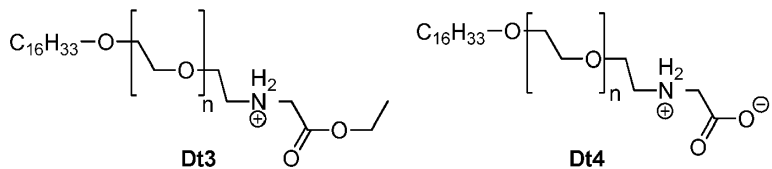
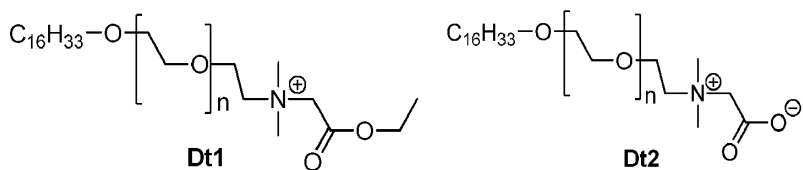
25 Los detergentes de Fórmula I pueden prepararse utilizando un material de compuesto de partida más simple para proporcionar detergentes nuevos y/o mejorados y sus propiedades. Los intermedios se analizaron mediante análisis LC-MS y se utilizaron sin purificación para realizar la siguiente etapa.

30 Un método para preparar los nuevos detergentes descritos en el presente documento incluye combinar secuencialmente el Compuesto A (como se muestra en el proceso 1) (por ejemplo, 1 eq.), yoduro de metiltrifenoisfosfonio (por ejemplo, 4 eq.) y N,N-dimetilformamida (DMF) (por ejemplo, 6 ml) a un matraz de fondo redondo cubierto con papel de aluminio (por ejemplo, 50 ml). La reacción se agita después durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, 3 días) en una atmósfera apropiada (por ejemplo, argón) a una temperatura apropiada (por ejemplo, temperatura ambiente). Después del período de tiempo suficiente (por ejemplo, 3 días), se puede monitorizar el progreso de la reacción (por ejemplo, usando cromatografía líquida analítica/espectrometría de masas (LC-MS). El aspecto de un patrón de producto intermedio puede confirmar la formación del detergente modificado. Este producto intermedio esperado (**Intermedio B**) puede o no puede aislarse o no (típico). A este producto intermedio, se pueden añadir sal de clorhidrato de éster de aminoácido (por ejemplo, 2 eq.) y Et₃N (por ejemplo, 2 eq.). La mezcla de reacción se puede calentar durante un período de tiempo apropiado (por ejemplo, 3-4 días) a una temperatura apropiada (por ejemplo, 65 °C). El progreso de la reacción se puede monitorizar usando LC-MS analítica. La mezcla de reacción luego se enfría normalmente a una temperatura apropiada (por ejemplo, temperatura ambiente) y se concentra (por ejemplo, en un rotovapor) a un volumen apropiado (por ejemplo, aproximadamente 2 ml). La mezcla bruta concentrada se puede purificar luego por HPLC preparativa. Las fracciones deseadas se pueden agrupar y concentrar (por ejemplo, en el rotovapor) para proporcionar el producto deseado (por ejemplo, como en el Proceso 1 para producir los detergentes iónicos Dt1, Dt3, Dt5, Dt7, Dt9, Dt11 y Dt12). Este producto puede luego someterse a una reacción de hidrólisis (por ejemplo, utilizando NaOH 2N). La mezcla de reacción puede agitarse después (por ejemplo, a temperatura ambiente) hasta que todo el material de partida se consuma según lo determinado por LC-MS analítica. Esto puede ir seguido de neutralización (por ejemplo, con Amberlite) para producir los productos finales zwitteriónicos (por ejemplo, Dt2, Dt4, Dt6, Dt10) o producto final aniónico (Dt8).

50 Por lo tanto, a continuación se muestra un método de ejemplo para el desarrollo de los nuevos detergentes de fórmula I:

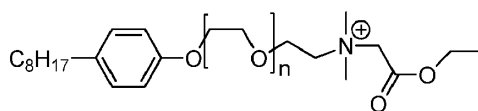


5 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y n son como se ha descrito anteriormente y X se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂(C₆H₅) y C(CH₃)₃. Los nuevos detergentes de Fórmula I pueden ser, por ejemplo, iónicos (por ejemplo, catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos). A continuación se muestran ejemplos de nuevos detergentes hechos con el Proceso 1:

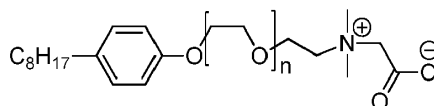


10

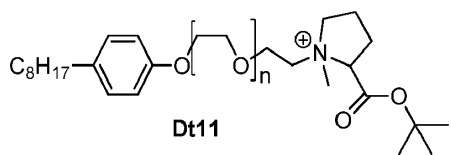
15



Dt9



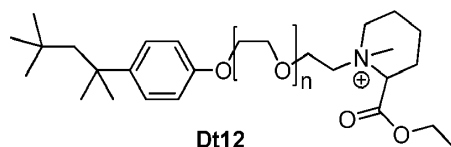
Dt10



Dt11

5

y



Dt12

10

en el que n es como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Cada n puede ser independientemente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30.

15 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para polimerizar y/o amplificar un ácido nucleico que comprende mezclar un ácido nucleico diana con al menos una polimerasa, un cebador, dNTP y al menos un detergente nuevo de Fórmula I, y polimerizar y/o amplificar el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los métodos pueden incluir al menos un cebador. En ciertas realizaciones, se proporciona una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende al menos una polimerasa, dNTP, al menos un cebador y al menos un detergente nuevo de Fórmula I. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen una o más etapas para detectar y/o cuantificar el marcador detectable para detectar y/o cuantificar el ácido nucleico amplificado.

25 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico mediante la inclusión de un nuevo detergente de Fórmula I. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos un detergente novedoso de Fórmula I y combinarla para formar una mezcla en condiciones tales que se proporcione la actividad polimerasa de la enzima. En ciertas realizaciones, la polimerasa es termoestable. En ciertas realizaciones, la polimerasa es termoestable. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan reacciones de amplificación con una eficiencia de amplificación similar a (por ejemplo, aproximadamente la misma), o mayor eficiencia de amplificación cuando se encuentra en presencia de un detergente convencional (por ejemplo, conocido) como, por ejemplo, NP-40 y/o Tween® 20. En algunas realizaciones, los nuevos detergentes descritos en el presente documento pueden sustituir a NP-40 y/o Tween® 20 en una reacción de amplificación.

35 En ciertas realizaciones, la "concentración efectiva" (por ejemplo, la cantidad que soportará una reacción de amplificación como la PCR) de al menos un nuevo detergente de Fórmula I (por ejemplo, Dt1, Dt2, Dt3, Dt4, Dt5, Dt6, Dt7), Dt8, Dt9, Dt10, Dt11 y/o Dt 12) en una mezcla de reacción puede ser más alta, igual o inferior a la requerida por los detergentes convencionales (por ejemplo, NP-40 y/o Tween 20). En algunas de estas realizaciones, la concentración efectiva de al menos uno o más detergentes nuevos (por ejemplo, Dt4) en una mezcla de reacción puede ser de hasta aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces menos que lo requerido por los detergentes convencionales como NP-40 y/o Tween® 20. Por ejemplo, el NP-40 o el Tween® 20 se incluyen normalmente en una reacción a aproximadamente el 0,01 % o menos (por ejemplo, como se determina por dilución de una solución madre en una mezcla de reacción). Los nuevos detergentes descritos en el presente documento pueden, en ciertas realizaciones, usarse a una concentración más baja (por ejemplo, como un porcentaje (es decir, p/v o v/v)) que los detergentes convencionales (por ejemplo, 0,002 % para Dt4 en comparación con 0,01 % de Tween® 20; las Figs. 11-18).

45 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para polimerizar y/o amplificar un ácido nucleico que comprende mezclar un ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ácido nucleico diana) con al menos una polimerasa, un cebador,

dNTP y al menos un detergente novedoso de fórmula I, y polimerización y/o amplificación del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen al menos un cebador. En ciertas realizaciones, se proporciona una o más mezclas de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende al menos una polimerasa, dNTP, al menos un cebador y al menos un detergente modificado de Fórmula I. En otras realizaciones, se proporcionan métodos para

5 usar tal(es) mezcla(s). Los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse utilizando cualquiera de diversas reacciones y sistemas.

Como se usa en el presente documento, los términos "amplificación", "amplificación de ácido nucleico" o "amplificar" se refieren a la producción de copias múltiples de un molde de ácido nucleico, o la producción de copias de secuencias de ácidos nucleicos múltiples que son complementarias del molde de ácido nucleico. Los términos (incluido el término "polimerizar") también pueden referirse a extender un molde de ácido nucleico (por ejemplo, mediante polimerización). La reacción de amplificación puede ser una reacción de extensión mediada por la polimerasa tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación conocidas puede ser adecuada para su uso como se describe en el presente documento. El término "amplificación" que normalmente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana se puede usar en el presente documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico.

La expresión "mezcla de reacción de amplificación" y/o "mezcla maestra" pueden referirse a una solución acuosa que comprende los diversos reactivos (algunos o todos) utilizados para amplificar un ácido nucleico diana. Tales reacciones también se pueden realizar utilizando soportes sólidos (por ejemplo, una matriz). Las reacciones también se pueden realizar en formato único o múltiple, según lo desee el usuario. Estas reacciones incluyen normalmente enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de amplificación, ácido nucleico diana y trifosfatos de nucleósido. En función del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método usado para

20 amplificar el ácido nucleico diana puede ser cualquiera disponible para un experto en la materia. Se puede utilizar cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Estos incluyen métodos lineales, logarítmicos y/o cualquier otro método de amplificación. Si bien esta divulgación puede tratar en general la PCR como la reacción de amplificación de ácido nucleico, se espera que los detergentes modificados descritos en el presente documento sean efectivos en otros tipos de reacciones de amplificación de ácido nucleico, incluidas las reacciones de amplificación mediada por polimerasa (como la amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación de recombinasa-polimerasa (RPA), y amplificación de cadena rodante (RCA), así como reacciones de amplificación mediadas por ligasa (como reacción de detección de ligasa (LDR), reacción en cadena de ligasa (LCR) y versiones gap de cada uno), y combinaciones de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos tales como LDR y PCR (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.797.470). Por ejemplo, se pueden usar los detergentes modificados en, por ejemplo, reacciones mediadas por ligado, en las que, por ejemplo, se usan sondas de ligado frente a los cebadores de PCR. Los métodos de ejemplo adicionales incluyen reacción en cadena de la polimerasa; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202; 4.683.195; 4.965.188; y/o 5.035.996), procedimientos isotérmicos (usando una o más ARN polimerasas (véase, por ejemplo, la publicación PCR N.º WO 2006/081222), desplazamiento de cadena (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º RE39007E), destrucción parcial de las moléculas de cebador (véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 2006/087574)), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, et al., *Genomics* 4: 560-569 (1990)), y/o Barany, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193 (1991)), sistemas de Q β ARN replicasa (véase, por ejemplo, publicación PCT n.º WO 1994/016108), sistemas basados en transcripción de ARN (por ejemplo, TAS, 3SR), amplificación por círculo rodante (RCA) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.854.033; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/265897; Lizardi et al. *Nat. Genet.* 19: 225-232 (1998); y/o Banér et al. *Nucleic Acid Res.*, 26: 5073-5078 (1998)), y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Little, et al. *Clin. Chem.* 45:777-784 (1999)), entre otros. Estos sistemas, junto con los muchos otros sistemas disponibles para el experto en la técnica, pueden ser adecuados para su uso en la polimerización y/o amplificación de ácidos nucleicos diana para su uso como se describe en el presente documento.

La "eficiencia de amplificación" puede referirse a cualquier producto que pueda cuantificarse para determinar el número de copias (por ejemplo, el término puede referirse a un amplicón de PCR, un producto de ligado de LCR y/o un producto similar). Si un detergente particular funciona como se desea en una reacción de amplificación particular, se puede determinar realizando al menos dos reacciones de amplificación separadas, cada reacción se lleva a cabo en ausencia y presencia, respectivamente, de un amplificador de cuantificación de detergente que se produce en cada reacción. También se pueden probar varias concentraciones o combinaciones de detergentes en mezclas de reacción separadas para determinar el efecto sobre la eficiencia de amplificación. La eficiencia de la amplificación y/o polimerización se puede determinar mediante varios métodos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, la determinación de curvas de dilución de calibración y el cálculo de pendientes, la determinación utilizando el software qBase como se describe en Hellemans et al., *Genome Biology* 8:R19 (2007), determinación utilizando el cálculo delta delta Cq (AACq) según lo descrito por Livak y Schmittgen, *Methods* 25:402 (2001) o mediante el método como se describe en Pfaffl, *Nucl. Acids Res.* 29:e45 (2001).

Los métodos de ejemplo para polimerizar y/o amplificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, reacciones de extensión mediadas por polimerasa. Por ejemplo, la reacción de extensión mediada por la polimerasa puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otras realizaciones, la reacción de amplificación de ácido nucleico es

una reacción multiplex. Por ejemplo, los métodos de ejemplo para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para su uso como se describe en el presente documento están disponibles comercialmente como TaqMan® (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º4,889,818; 5,079,352; 5,210,015; 5,436,134; 5,487,972; 5,658,751; 5,210,015; 5,487,972; 5,538,848; 5,618,711; 5,677,152; 5,723,591; 5,773,258; 5,789,224; 5,801,155; 5,804,375; 5,876,930; 5,994,056; 6,030,787; 6,084,102; 6,127,155; 6,171,785; 6,214,979; 6,258,569; 6,814,934; 6,821,727; 7,141,377; y/o 7,445,900). Los ensayos TaqMan® se llevan a cabo normalmente realizando una amplificación de ácido nucleico en un polinucleótido objetivo usando una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa de 5' a 3', un cebador capaz de hibridar con dicho polinucleótido objetivo y una sonda de oligonucleótidos capaz de hibridarse con dicho polinucleótido diana 3' en relación con dicho cebador. La sonda oligonucleotídica incluye normalmente un marcador detectable (por ejemplo, una molécula indicadora fluorescente) y una molécula de inactivación capaz de inactivar la fluorescencia de dicha molécula indicadora. Normalmente, el marcador detectable y la molécula inactivadora forman parte de una única sonda. A medida que avanza la amplificación, la polimerasa digiere la sonda para separar el marcador detectable de la molécula inactivadora. El marcador detectable (por ejemplo, fluorescencia) se monitoriza durante la reacción, en la que la detección del marcador corresponde a la aparición de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, cuanto mayor sea la señal, mayor será la cantidad de amplificación). Las variaciones de los ensayos TaqMan® (por ejemplo, el ensayo TaqMan® enriquecido con LNA™) son conocidas en la técnica y serían adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Otro sistema de ejemplo adecuado para su uso como se describe en el presente documento utiliza sondas de doble cadena en métodos de hibridación por desplazamiento (véase, por ejemplo, Morrison et al. Anal. Biochem., 18:231–244 (1989); y/o Li, et al. Nucleic Acids Res., 30(2,e5) (2002)). En tales métodos, la sonda normalmente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferentes longitudes, en los que se incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula inactivadora. Cuando no está unido a un ácido nucleico objetivo, el inactivador suprime la señal del marcador detectable. La sonda se vuelve detectable tras la hibridación de desplazamiento con un ácido nucleico diana. Se pueden usar múltiples sondas, cada una de las cuales contiene diferentes marcadores detectables, de manera que se pueden consultar múltiples ácidos nucleicos diana en una sola reacción.

Los métodos de ejemplo adicionales para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos diana adecuados para su uso como se describe en el presente documento implican "balizas moleculares", que son sondas de oligonucleótidos en forma de horquilla de una sola hebra. En presencia de la secuencia objetivo, la sonda se despliega, se une y emite una señal (por ejemplo, fluorescencia). Una baliza molecular normalmente incluye al menos cuatro componentes: 1) el "bucle", una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria de la secuencia diana; 2) dos "vástagos" de 5–7 nucleótidos que se encuentran en cada extremo del bucle y que son complementarios entre sí; 3) en el extremo 5', un marcador detectable; y 4) en el extremo 3', un resto inactivador que evita que el marcador detectable emita una sola cuando la sonda está en forma de bucle cerrado (por ejemplo, no está unida a un ácido nucleico diana). Por lo tanto, en presencia de un objetivo complementario, la parte de "vástago" de la baliza se separa y la sonda se hibrida con el objetivo. También se conocen otros tipos de balizas moleculares y pueden ser adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Las balizas moleculares se pueden usar en diversos sistemas de ensayo. Uno de estos sistemas es la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA®), un proceso isotérmico de una sola etapa para polimerizar y/o amplificar ARN para ADN de doble cadena sin ciclos de temperatura. Una reacción NASBA generalmente requiere virus de mieloblastosis aviar (AMV), transcriptasa inversa (RT), ARN polimerasa T7, ARNasa H y dos cebadores oligonucleótidos. Después de la amplificación, el ácido nucleico diana amplificado puede detectarse utilizando una baliza molecular. Otros usos para balizas moleculares son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en el presente documento.

El sistema Scorpions™ es otro formato de ensayo de ejemplo que puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. Los cebadores Scorpions™ son moléculas bifuncionales en las que un cebador está unido covalentemente a la sonda, junto con un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo) y un resto inactivador no detectable que inactiva la fluorescencia del marcador detectable. En presencia de un ácido nucleico objetivo, el marcador detectable y el inactivador se separan, lo que conduce a un aumento de la señal emitida desde el marcador detectable. Normalmente, un cebador usado en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5' junto con un elemento "bloqueador de PCR" (por ejemplo, un monómero de hexaetilenglicol (HEG) (Whitcombe, et al. Nat. Biotech. 17: 804–807 (1999)) al comienzo del bucle de horquilla. La sonda normalmente incluye una secuencia principal autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un inactivador en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales (por ejemplo, PCR), el cebador se hibrida al objetivo y la extensión se produce debido a la acción de la polimerasa. El sistema Scorpions™ se puede usar para examinar e identificar mutaciones puntuales utilizando múltiples sondas que se pueden marcar de manera diferente para distinguir entre las sondas. Utilizando la PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región objetivo recién sintetizada se unirá a la misma cadena que la sonda. Tras el segundo ciclo de desnaturalización e hibridación, la sonda y la diana hibridan. A continuación, la secuencia en bucle hibrida con una parte del producto de PCR recién producido. Esto da como resultado la separación del marcador detectable del inactivador y causa la emisión de la señal. Otros usos para tales sondas marcadas son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en el presente documento.

Las polimerasas de ácido nucleico que pueden emplearse en las reacciones de amplificación de ácido nucleico

desveladas pueden ser cualquiera que funcione para llevar a cabo la reacción deseada, incluyendo, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico procariota, fúngica, viral, bacteriófaga, vegetal y/o eucariótica. Como se usa en el presente documento, el término "ADN polimerasa" se refiere a una enzima que sintetiza una cadena de ADN *de novo* utilizando una cadena de ácido nucleico como molde. La ADN polimerasa utiliza un ADN o ARN existente como molde para la síntesis de ADN y cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos junto con la cadena del molde, que lee. La nueva hebra de ADN sintetizada es complementaria de la hebra molde. La ADN polimerasa puede añadir nucleótidos libres solo al extremo 3'-hidroxilo de la nueva cadena de formación. Sintetiza oligonucleótidos a través de la transferencia de un monofosfato de nucleósido desde un trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTP) al grupo 3'-hidroxilo de una cadena oligonucleotídica en crecimiento. Esto da como resultado el alargamiento de la nueva hebra en una dirección de 5' a 3'. Dado que la ADN polimerasa solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar una reacción de síntesis de ADN, la ADN polimerasa necesita un cebador al que pueda añadir el primer nucleótido. Los cebadores adecuados pueden comprender oligonucleótidos de ARN o ADN, o quimeras de los mismos (por ejemplo, cebadores quiméricos de ARN/ADN). Las ADN polimerasas pueden ser ADN polimerasas naturales o una variante de enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. Por ejemplo, puede incluir una ADN polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadena, una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa de 5' a 3', una ADN polimerasa que tiene una actividad de transcriptasa inversa o una ADN polimerasa que tiene una actividad de endonucleasa.

Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas también pueden comprender holoenzimas, porciones funcionales de las holoenzimas, polimerasa quimérica o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta divulgación, una ADN polimerasa también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Los ejemplos no limitantes de polimerasas pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa mitocondrial eucariótica, ADN polimerasa I, II, III, IV y/o V procariótica; polimerasa eucariótica α , β , γ , δ , ϵ , η , ζ , ι y/o κ ; ADN polimerasa I de *E. coli*; subunidades alfa y/o épsilon de la ADN polimerasa III de *E. coli*; polimerasa IV de *E. coli*, polimerasa V de *E. coli*; ADN polimerasa I de *T. aquaticus*; ADN polimerasa I de *B. stearothermophilus*; polimerasas de Euryarchaeota; desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT); polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; polimerasas de síntesis de translesión; transcriptasa inversa; y/o telomerasa. Ejemplos no limitativos de ADN polimerasas termoestables adecuadas que pueden usarse incluyen ADN polimerasas Taq, Tfl, Tfi, Pfu y Vent™, cualquier ADN polimerasa modificada genéticamente, cualquiera que tenga una actividad de exonucleasa 3' a 5' reducida o insignificante (por ejemplo, ADN polimerasa SuperScript™) y/o ADN polimerasas genéticamente modificadas (por ejemplo, aquellas que tienen la mutación del sitio activo F667Y o el equivalente de F667Y (por ejemplo, en Tth), AmpliTaq®FS, ThermoSequenase™, AmpliTaq® Gold, Therminator I, Therminator II, Therminator III, Therminator Gamma (todos disponibles en New England Biolabs, Beverly, MA), y/o cualquiera de sus derivados y fragmentos. Otras polimerasas de ácido nucleico también pueden ser adecuadas como entendería un experto en la técnica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona mezclas de reacción para polimerizar y/o amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia diana). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. Los métodos también pueden incluir una o más etapas para detectar el marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado. Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" se refiere a cualquiera de varias moléculas de señalización indicativas de amplificación. Por ejemplo, SYBR® Green y otros colorantes de unión al ADN son marcadores detectables. Dichos marcadores detectables pueden comprender o pueden ser, por ejemplo, agentes intercaladores de ácido nucleico o agentes no intercaladores. Como se usa en el presente documento, un agente de intercalación es un agente o resto capaz de una insertarse de forma no covalente entre pares de bases apiladas de una molécula de ácido nucleico de doble cadena. Un agente no intercalador es uno que no se inserta en la molécula de ácido nucleico de doble cadena. El agente de unión a ácido nucleico puede producir una señal detectable directa o indirectamente. La señal puede ser detectable directamente usando, por ejemplo, fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente usando, por ejemplo, cualquier resto o ligando que esté afectado de manera detectable por la proximidad al ácido nucleico bicatenario es adecuado, tal como un resto o ligando de unión marcado sustituido unido al agente de unión a ácido nucleico. Normalmente, es necesario que el agente de unión a ácido nucleico produzca una señal detectable cuando se une a un ácido nucleico bicatenario que se distingue de la señal producida cuando ese mismo agente está en solución o unido a un ácido nucleico monocatenario. Por ejemplo, agentes de intercalación, tales como bromuro de etidio, brillan más intensamente cuando se intercalan en el ADN de doble cadena que cuando se unen a ADN, ARN monocatenario o en solución (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,994,056; 6,171,785; y/o 6,814,934). De manera similar, la actinomomicina D emite fluorescencia en la porción roja del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos monocatenarios y la fluorescencia en la porción verde del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos bicatenarios. Y en otro ejemplo, se ha informado que el psoraleno 4-aminometil-4-5', 8-trimetilpsoraleno (AMT) fotorreactivo exhibe una absorción disminuida en longitudes de onda largas y fluorescencia tras la intercalación en el ADN de doble cadena (Johnson et al. Photochem. & Photobiol., 33:785-791 (1981)). Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.257.774 describe la unión directa de intercaladores fluorescentes al ADN (por ejemplo, sales de etidio, daunomicina, mepacrina y naranja acridina, 4',6-diamidino- α -fenilindol). Los agentes no intercaladores (por ejemplo, ligantes de surco menores como se describen en el presente documento, como Hoechst 33258, distamicina, netropsina) también pueden ser adecuados para su uso. Por ejemplo, Hoechst 33258 (Searle, et al. Nucl. Acids Res. 18(13):3753-3762 (1990)) muestra una fluorescencia alterada con una cantidad creciente de la diana. Los ligantes de surcos menores se describen con más detalle en otras partes del presente documento.

Otros colorantes de unión a ADN están disponibles para un experto en la técnica y pueden usarse solos o en combinación con otros agentes y/o componentes de un sistema de ensayo. Los colorantes de unión a ADN de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, acridinas (por ejemplo, acridina naranja, acriflavina), actinomicina D (Jain, et al. J. Mol. Biol. 68:21 (1972)), antramicina, BOBO™-1, BOBO™-3, BO-PRO™-1, cbromomicina, DAPI (Kapuseinski, et al. Nucl. Acids Res. 6 (112): 3519 (1979)), daunomicina, distamicina (por ejemplo, distamicina D), colorantes descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.387.887, elipticina, sales de etidio (por ejemplo, bromuro de etidio), fluorocoumanina, intercaladores fluorescentes como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.257.774, GelStar® (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, Me.), Hoechst 33258 (Searle y Embrey, Nucl. Acids Res. 18:3753-3762 (1990)), Hoechst 33342, homidio, JO-PRO™-1, colorantes LIZ, LO-PRO™-1, mepacrina, mitramicina, colorantes NED, netropsina, 4', 6'-diamidino- α -fenilindol, proflavina, POPO™-1, POPO™-3, PO-PRO™-1, yoduro de propidio, polipiridilos de rutenio, S5, SYBR® Gold, SYBR® Green I (patentes de EE. UU. números 5.436.134 y 5.658.751), SYBR® Green II, azul SYTOX®, verde SYTOX®, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, azul SYTOX®, TO-PRO®-1, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin), TOTO™-3, YO-PRO®-1, y YOYO®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. verde SYBR® Green I (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.436.134; 5.658.751; y/o 6.569.927), por ejemplo, se ha utilizado para controlar las reacciones de PCR. Otros colorantes de unión al ADN también pueden ser adecuados, como entendería un experto en la técnica.

Para uso como se describe en el presente documento, uno o más marcadores y/o agentes de inactivación detectables pueden unirse a uno o más cebadores y/o sondas (por ejemplo, marcador detectable). El marcador detectable puede emitir una señal cuando está libre o cuando se une a uno de los ácidos nucleicos diana. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está cerca de otro marcador detectable. Los marcadores detectables también se pueden usar con moléculas inactivadoras de modo que la señal solo sea detectable cuando no esté lo suficientemente cerca de la molécula inactivadora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede hacer que el marcador detectable se libere de la molécula inactivadora. Se puede usar cualquiera de los diversos marcadores detectables para marcar los cebadores y las sondas utilizadas en los métodos descritos en el presente documento. Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, el marcador detectable se puede unir a una sonda, que se puede incorporar a un cebador, o se puede unir de otra manera al ácido nucleico diana amplificado (por ejemplo, un agente de unión a ácido nucleico detectable, como un agente intercalador o colorante no intercalador). Cuando se usa más de un marcador detectable, cada uno debe diferir en sus propiedades espectrales de modo que las etiquetas puedan distinguirse entre sí, o de manera que, juntos, los marcadores detectables emitan una señal que no es emitida por ningún marcador detectable solo. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, por ejemplo, un colorante fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, un grupo químico que puede ser excitado por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), "colorantes aceptores" capaces de inactivar una señal fluorescente de un colorante donante fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, fluoresceínas (por ejemplo, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-hidroxi triptamina (5-HAT); 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC; 6-carboxi-1,4-dicloro-2', 7'-diclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-1,4-dicloro-2', 4', 5', 7'-tetraclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE); fluoróforos Alexa fluor® (p. ej., 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY® (por ejemplo, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, conjugado TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (por ejemplo, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumarina, faloidina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicumarina, calceína, calceína AM, azul de calceína, colorantes de calcio (por ejemplo, calcio carmesí, verde de calcio, naranja de calcio, blanco de calcofluor), azul Cascade, amarillo Cascade; Colorantes Cy™ (por ejemplo, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), GFP cian, Ffluorosensor de AMP cíclico (FICRHR), proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (por ejemplo, GFP, EGFP), proteína azul fluorescente (por ejemplo, BFP, EBFP, EBFP2, azurita, mKalama1), proteína fluorescente cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, YFP, Citrine, Venus, YPet), pares donantes/aceptores de FRET (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcil, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY® FL/BODIPY® FL, Fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker® y LysoSensor™ (por ejemplo, LysoTracker® DC) 22, LysoTracker® Blue - White DPX, LysoTracker® Yellow HCK - 123, LysoTracker® Green DND - 26, LysoTracker® Red DND - 99, LysoSensor™ Blue DND - 167, LysoSensor™ Green DND - 189, LysoSensor™ Green DND - 153, LysoSensor™ Yellow/Blue DND - 160, LysoSensor™ Yellow/Blue 10,000 MW dextrano), verde Oregón (por ejemplo, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (por ejemplo, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5 - TAMRA), 5 GLD, 6 - carboxirodamina 6G, Lissamine, Lissamine Rodamina B, falicidina, faloidina, rojo, Rhod -2, ROX (6 - carboxi - X - rodamina), 5 - ROX (carboxi - X - rodamina), sulforodamina B puede C, sulforodamina G Extra, TAMRA (6 - carboxitetrametilrodamina), tetrametilrodamina (TRITC), WT), rojo Texas, rojo Texas - X, VIC y otros marcadores descritos en, por ejemplo, la publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009/0197254, entre otros, como conocerán los expertos en la técnica. También se pueden usar otros marcadores detectables (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0197254), como conocerán los expertos en la técnica. Cualquiera de estos sistemas y marcadores detectables, así como muchos otros, pueden usarse para detectar ácidos nucleicos diana amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden estar basados en secuencias (también denominados en el presente

documento como "marcador detectable específico de locus"), por ejemplo, sondas 5'-nucleasas. Dichas sondas pueden comprender uno o más marcadores detectables. Se conocen varios marcadores detectables en la técnica, por ejemplo (sondas TaqMan® descritas en el presente documento (véase también la patente de Estados Unidos n.º 5.538.848) varias balizas moleculares de vástago-bucle (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.103.476 y 5.925.517 yd Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnology* 14:303–308 (1996)), balizas moleculares sin vástago o lineales (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 99/21881; la patente de Estados Unidos n.º 6.485.901), PNA Molecular Beacons™ (véanse, por ejemplo las patentes de Estados Unidos n.º 6.355.421 y 6.593.091), balizas de PNA lineales (véase, por ejemplo, Kubista et al., *SPIE* 4264:53–58 (2001)), sondas no FRET (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.150.097), sondas Sunrise®/Amplifluor® (patente de Estados Unidos n.º 6.548.250), sondas de vástago-bucle y dúplex Scorpions™ (Solinas et al., *Nucleic Acids Research* 29:E96 (2001) y patente de Estados Unidos n.º 6.589.743), sondas de bucle en bolsa (patente de Estados Unidos n.º 6.590.091), sondas de pseudonudos (patente de Estados Unidos n.º 6.589.250), ciclicones (patente de Estados Unidos n.º 6.383.752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas de horquilla (patente de Estados Unidos n.º 6.596.490), ácido nucleico peptídico (PNA) sondas de iluminación (Svanvik, et al. *Anal Biochem* 281:26–35 (2001)), sondas de nanopartículas autoensambladas, sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.485.901; Mhlanga et al., *Methods* 25:463–471 (2001); Whitcombe et al., *Nature Biotechnology*. 17:804–807 (1999); Isacson et al., *Molecular Cell Probes*. 14:321–328 (2000); Svanvik et al., *Anal Biochem*. 281:26–35 (2000); Wolffs et al., *Biotechniques* 766:769–771 (2001); Tsourkas et al., *Nucleic Acids Research*. 30:4208–4215 (2002); Riccelli et al., *Nucleic Acids Research* 30:4088–4093 (2002); Zhang et al., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Shanghai). 34:329–332 (2002); Maxwell et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9606–9612 (2002); Broude et al., *Trends Biotechnol.* 20:249–56 (2002); Huang et al., *Chem Res. Toxicol.* 15:118–126 (2002); y Yu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 14:11155–11161 (2001); QuantiProbes® (www.qiagen.com), HyBeacons® (French, et al. *Mol. Cell. Probes* 15:363–374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, et al. *Nucl. Acids Res.* 30:e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8790–8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q–PNA (Fiandaca, et al. *Genome Res.* 11:609–611 (2001)), Plexor® (www.Promega.com), cebadores LUX™ (Nazarenko, et al. *Nucleic Acids Res.* 30:e37 (2002)), cebadores DzyNA (Todd, et al. *Clin. Chem.* 46:625–630 (2000)). Los marcadores detectables también pueden comprender restos inactivadores no detectables que inactivan la fluorescencia del marcador detectable, que incluyen, por ejemplo, inactivadores de agujeros negros (Biosearch), inactivadores Iowa Black® (IDT), inactivadores QSY (Molecular Probes) y Dabsyl e inactivadores DabcyL de sulfonato/carboxilato (Epoch). Los marcadores detectables también pueden comprender dos sondas, en las que, por ejemplo, un fluoróforo está en una sonda y un inactivador en la otra, en la que la hibridación de las dos sondas en una diana inactiva la señal, o en la que la hibridación en una diana altera la señal de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Los sistemas de ejemplo también pueden incluir sistemas de salicilato de FRET/ligando de DTPA, s (véase, por ejemplo, Oser et al. *Angew. Chem. Int. Engl.* 29(10): 1167 (1990)), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas y/o ensayos descritos en la patente europea n.º EP 070685 y/o en la patente de Estados Unidos n.º 6.238.927. Los marcadores detectables también pueden comprender derivados de sulfonato de colorantes de fluoresceína con SO₃ en lugar del grupo carboxilato, formas de fosforamidita de fluoresceína, formas de fosforamidita de Cy5 (disponibles, por ejemplo, de Amersham).

Otras realizaciones proporcionan métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico mediante la inclusión de un nuevo detergente de Fórmula I. También se proporcionan métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos un nuevo detergente de Fórmula I y combinarlos para formar una mezcla en condiciones tales que la actividad de la polimerasa de la enzima se estabilice. La polimerasa puede estar disponible para el experto en la técnica, incluidas, entre otras, las desveladas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la polimerasa es termoestable.

Los detergentes y métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar diversos ácidos nucleicos diana de una muestra de prueba. Un ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico para el cual un sistema de ensayo está diseñado para identificar o detectar que está presente (o no) y/o cuantificar en una muestra de prueba. Dichos ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, los de agentes infecciosos (por ejemplo, virus, bacterias, parásitos y similares), un proceso de enfermedad como cáncer, diabetes o similares, o para medir una respuesta inmunitaria. Las "muestras de prueba" de ejemplo incluyen varios tipos de muestras, tales como muestras biológicas. Las muestras biológicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, un fluido corporal (por ejemplo, sangre, saliva, fluido espinal), una muestra de tejido, un producto de alimento (por ejemplo, carne) o bebida (por ejemplo, leche), o similares. Los ácidos nucleicos expresados pueden incluir, por ejemplo, genes para los cuales la expresión (o la falta de la misma) está asociada con afecciones médicas tales como enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas, protozoarias) o cáncer. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para detectar contaminantes (por ejemplo, bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, de alimentos o bebidas. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo salvaje (por ejemplo, un alelo mutante en presencia de 106 alelos de tipo salvaje). Los métodos son útiles para, por ejemplo, detectar una enfermedad residual mínima (por ejemplo, células cancerosas restantes raras durante la remisión, especialmente mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores previamente identificados dentro de los tumores), y/o medir la carga de mutación (por ejemplo, la frecuencia de mutaciones somáticas específicas presentes en tejidos normales, como sangre u orina).

También se proporcionan kits para realizar los métodos descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a un conjunto empaquetado de componentes relacionados,

normalmente uno o más compuestos o composiciones. El kit puede comprender un par de oligonucleótidos para polimerizar y/o amplificar al menos un ácido nucleico diana de una muestra, uno o más detergentes nuevos (por ejemplo, y/o detergentes convencionales, o una mezcla que contenga cualquiera de los mismos), un biocatalizador (por ejemplo, ADN polimerasa) y/o una o más sondas correspondientes marcadas con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contengan ácidos nucleicos diana previamente definidos para usarse en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente soluciones madre, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos necesarios para la detección, tubos, membranas y similares que se pueden usar para completar la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, se incluyen múltiples conjuntos de cebadores. En una realización, el kit puede incluir uno o más de, por ejemplo, un tampón (por ejemplo, Tris), una o más sales (por ejemplo, KCl), glicerol, dNTP (dA, dT, dG, dC, dU), BSA recombinante (seroalbúmina bovina), un colorante (por ejemplo, colorante de referencia pasivo ROX), uno o más detergentes (por ejemplo, Dt4), uno o más mecanismos de PCR de inicio en caliente, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y/o gelatina (por ejemplo, fuente de pescado o bovina). También se contemplan otras realizaciones de sistemas y kits particulares que entenderán los expertos en la técnica.

Para describir y señalar de manera más clara y concisa el objetivo de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se utilizan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la especificación, los términos específicos de ejemplo debe considerarse como ejemplos no limitantes.

Las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La expresión aproximadamente, como se usa en el presente documento a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa que podría variarse permisivamente sin que de cómo resultado un cambio en la función básica a la que se refiere. En consecuencia con esto, un valor modificado por un término tal como "aproximadamente" no se tiene que limitar al valor preciso especificado. En caso necesario, se han suministrado intervalos y dichos intervalos incluyen todos los subintervalos entremedias.

En la presente divulgación, el uso del singular puede incluir el plural, a menos que se indique lo contrario o a menos que, como entenderá un experto en la materia a la luz de la presente divulgación, el singular sea la única realización funcional. Así, por ejemplo, "uno/una" puede significar más de uno, y "una realización" puede significar que la descripción se aplica a múltiples realizaciones. La frase "y/o" denota una forma abreviada de indicar que la combinación específica se contempla en combinación y, por separado, en la alternativa.

Se apreciará que existe una "aproximación" antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc., tratados en las presentes enseñanzas, de manera que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes enseñanzas en el presente documento. Además, el uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "contienen", "que contiene", "contiene", "incluyen", "incluye" e "incluido/incluyendo" no pretende ser limitante. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la detallada son ejemplos y explicaciones solamente y no restringen la invención.

A menos que se indique específicamente en la especificación anterior, las realizaciones en la especificación anterior que citan "que comprende" varios componentes también se contemplan como "consistentes en" o "que consisten esencialmente en" los componentes citados; las realizaciones en la especificación que citan "que consiste en" varios componentes también se contemplan como "que comprenden" o "que consisten esencialmente en" los componentes enumerados; y las realizaciones en la especificación que citan "que consisten esencialmente en" varios componentes también se contemplan como "consistentes en" o "que comprenden" los componentes citados (esta intercambiabilidad no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

Como se usa en el presente documento, los términos "nucleótido" o "base de nucleótido" se refieren a un fosfato de nucleósido. Incluye, pero no se limita a los mismos, un nucleótido natural, un nucleótido sintético, un nucleótido modificado o un resto de reemplazo sustituto o un nucleótido universal (por ejemplo, inosina). El nucleósido fosfato puede ser un nucleósido monofosfato, un nucleósido difosfato o un nucleósido trifosfato. El resto de azúcar en el nucleósido fosfato puede ser un azúcar pentosa, como la ribosa, y el sitio de esterificación de fosfato puede corresponder al grupo hidroxilo unido a la posición C-5 del azúcar pentosa del nucleósido. Un nucleótido puede ser, pero no se limita a los mismos, un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) o un ribonucleósido trifosfato (NTP). Los nucleótidos pueden representarse utilizando letras alfabéticas (designación en letra). Por ejemplo, A denota adenosina (es decir, un nucleótido que contiene la base nucleotídica, adenina), C denota citosina, G denota guanosina, T denota timidina, U denota uracilo e I denota inosina. N representa cualquier nucleótido (por ejemplo, N puede ser cualquiera de A, C, G, T/U o I). También se pueden usar análogos naturales y sintéticos, incluyendo por ejemplo hipoxantina, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, N4-metilcitosina, 5, N4-etenciatosina, 4-aminopirrazolo [3,4-d] pirimidina y 6-amino-4-hidroxi [3,4-d] pirimidina, entre otros. Las unidades de nucleótidos de los oligonucleótidos también pueden tener una función de enlace cruzado (por ejemplo, un agente alquilante).

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" o "polinucleótido" se refiere a un oligómero de nucleótido o derivados del mismo. Los oligómeros pueden ser ADN, ARN o análogos de los mismos (por ejemplo,

análogo de fosforotioato). Los oligómeros también pueden incluir bases modificadas y/o esqueletos (por ejemplo, enlace de fosfato modificado o resto de azúcar modificado). Los ejemplos no limitantes de esqueletos sintéticos que confieren estabilidad y/u otras ventajas a los oligómeros pueden incluir enlaces fosforotioato, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado (Singh, et al. Chem. Commun. 4:455–456 (1998)), ácido nucleico de xilosa y/o análogos de los mismos. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden tener cualquier longitud "n". Por ejemplo, n puede ser cualquiera de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, etc. número de nucleótidos. La estructura del polinucleótido (N)_n representa un oligonucleótido que consiste en n número de nucleótidos N (por ejemplo, (I)₈ es representativo de un oligonucleótido que tiene la secuencia IIIIIIII; o (A)₁₂ es representativo de un oligonucleótido que tiene la secuencia AAAAAAAAAAAAAA). Otros tipos de oligonucleótidos o polinucleótidos también pueden ser adecuados para su uso, como entenderán los expertos en la técnica a partir de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos o derivados de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico que se desea amplificar en una reacción de amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido nucleico diana comprende un molde de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido o un ácido nucleico. A lo largo de la especificación, siempre que un oligonucleótido/ácido nucleico está representado por una secuencia de letras, los nucleótidos están en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha. Por ejemplo, un oligonucleótido representado por una secuencia (I)_n(A)_n en la que n = 1, 2, 3, 4 y así sucesivamente, representa un oligonucleótido en el que el (los) nucleótido (s) en el extremo 5' es inosina y el (los) nucleótido (s) en el extremo 3' es adenosina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de reacción" se refiere a la combinación de reactivos o soluciones de reactivos, que se utilizan para llevar a cabo un análisis químico o un ensayo biológico. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende todos los componentes necesarios para llevar a cabo una reacción de síntesis/amplificación de ácido nucleico (ADN). Como se ha descrito anteriormente, tales mezclas de reacción pueden incluir al menos un par de cebadores de amplificación adecuados para polimerizar y/o amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés y al menos un detergente. Como se ha descrito anteriormente, una mezcla de reacción adecuada también puede incluir una "mezcla maestra" que contiene los componentes (por ejemplo, normalmente sin incluir el par de cebadores) necesarios para realizar una reacción de amplificación. La mezcla maestra se puede combinar con uno o más detergentes para formar una mezcla de reacción. Otras realizaciones de mezclas de reacción también se contemplan en el presente documento como entenderán los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, los términos "solución de reactivo" o "solución adecuada para realizar una reacción de síntesis de ADN" se refieren a cualquiera o todas las soluciones, que se usan normalmente para realizar una reacción de amplificación o síntesis de ADN. Incluyen, pero no se limitan a las mismas, soluciones usadas en métodos de amplificación de ADN, soluciones usadas en reacciones de amplificación por PCR, o similares. La solución adecuada para la reacción de síntesis de ADN puede comprender un tampón, sales y/o nucleótidos. Puede comprender además cebadores y/o moldes de ADN para amplificar. Una o más soluciones de reactivos se incluyen normalmente en las mezclas de reacciones o mezclas maestras descritas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" o "secuencia de cebador" se refiere a un oligonucleótido lineal corto que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, un molde de ADN para amplificar) para cebar una reacción de síntesis de ácido nucleico. El cebador puede ser un oligonucleótido de ARN, un oligonucleótido de ADN o una secuencia química (por ejemplo, que comprende ARN y ADN). El cebador puede contener nucleótidos naturales, sintéticos o modificados. Los límites superior e inferior de la longitud del cebador se determinan empíricamente. El límite inferior en la longitud del cebador es la longitud mínima que se requiere para formar un dúplex estable en la hibridación con el ácido nucleico diana en condiciones de reacción de amplificación de ácido nucleico. Los cebadores muy cortos (generalmente de menos de 3 nucleótidos de largo) no forman dúplex termodinámicamente estables con ácido nucleico diana en tales condiciones de hibridación. El límite superior a menudo está determinado por la posibilidad de tener una formación dúplex en una región distinta de la secuencia de ácido nucleico predeterminada en el ácido nucleico diana. En general, las longitudes de cebador adecuadas están en el intervalo de aproximadamente cualquiera de, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, (y así sucesivamente) nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un hidrocarburo que es opcionalmente lineal o ramificado, y puede estar completamente saturado, monoinsaturado o poliinsaturado. Además, el término "alquilo", como se usa en el presente documento, incluye además una o más sustituciones en uno o más átomos de carbono del fragmento de cadena de hidrocarburo.

Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un resto aromático que tiene un anillo único o múltiples anillos condensados, cada uno de los cuales está opcional e independientemente sustituido con H, halógeno, ciano, azido, ácido sulfónico, álcali o sal de amonio de ácido sulfónico, ácido carboxílico., sal biológicamente compatible de ácido carboxílico, nitro, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alquiltio, amino, monoalquilamino, dialquilamino o alquilamido.

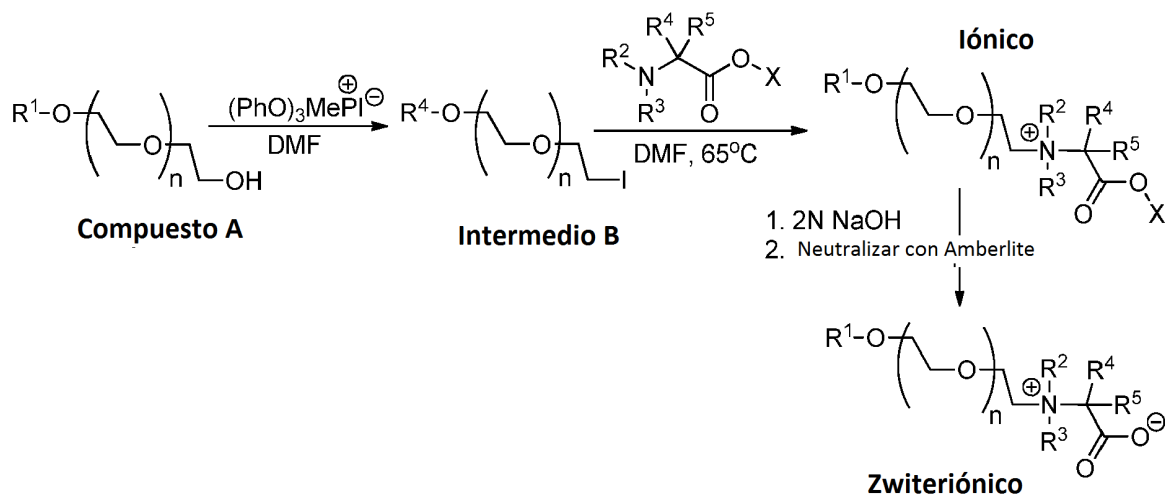
Como se usa en el presente documento, "sustituido" se refiere a una molécula en la que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan con uno o más átomos, grupos funcionales o restos que no son de hidrógeno. Por ejemplo, un nitrógeno no sustituido es $-\text{NH}_2$, mientras que un nitrógeno sustituido es $-\text{NHCH}_3$. Los sustituyentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a los mismos, halo, por ejemplo, flúor y cloro, alquilo, alqueno, alquino, sulfato, sulfona, sulfonato, amino, amonio, amilo, nitrilo, alcoxi, fenoxi, aromático, fenilo, policíclico, aromático, y heterociclo.

Ciertas realizaciones se describen adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estas realizaciones se proporcionan solo como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera. Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

Ejemplos

Desarrollo de nuevos detergentes

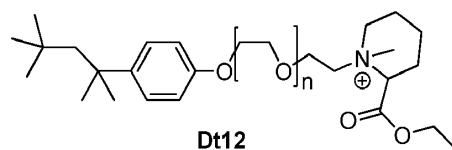
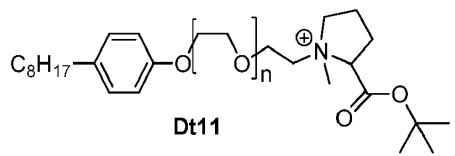
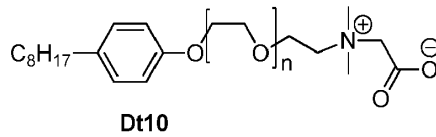
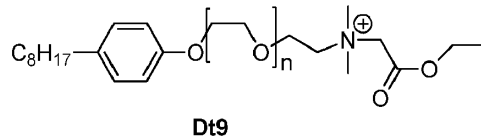
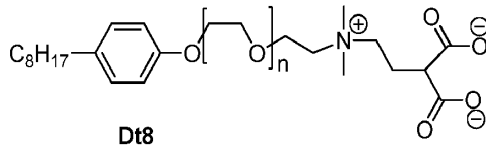
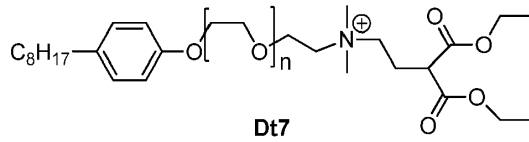
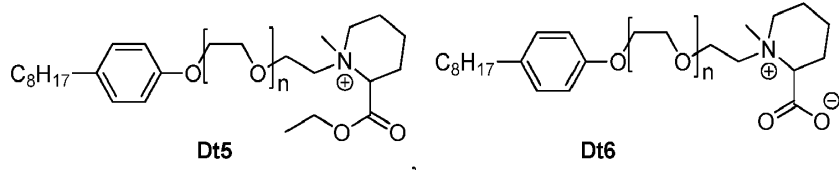
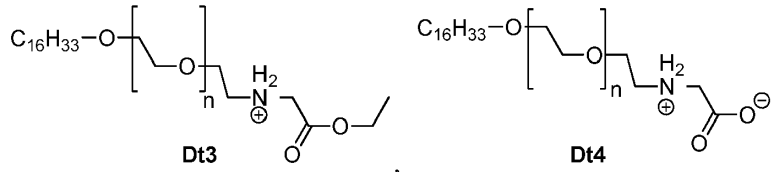
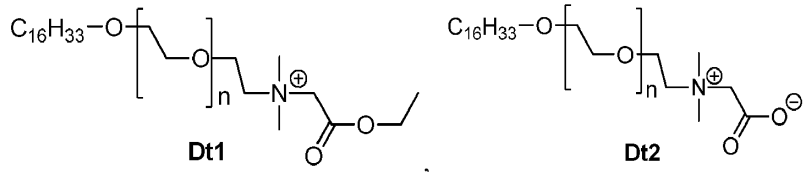
Los nuevos detergentes Dt1, Dt2, Dt3, Dt4, Dt5, Dt6, Dt7, Dt8, Dt9, D10, Dt11 y Dt12 se desarrollaron utilizando el Proceso 1 que se describe a continuación:



Proceso 1

en la que $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$ y n son como se ha descrito anteriormente y X se selecciona del grupo que consiste en $\text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ y $\text{C}(\text{CH}_3)_3$. Los nuevos detergentes de Fórmula I pueden ser, por ejemplo, iónicos (por ejemplo, catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos).

Como se muestra en el Proceso 1, el **Compuesto A** (1 eq.), yoduro de metiltrifenoxifosfonio (4 eq.) y N, N-dimetilformamida (6 ml) se añadieron secuencialmente a un matraz de fondo redondo cubierto con papel de aluminio de 50 ml. La reacción se dejó agitar durante 3 días bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de 3 días, se monitorizó el progreso de la reacción usando LC-MS analítica. La aparición del patrón de producto intermedio confirmará su formación. Este producto intermedio esperado (**Intermedio B**) no se aisló. A este producto intermedio obtenido de la etapa anterior, se añadió sal de clorhidrato de éster de aminoácido (2 eq.) y Et_3N (2 eq.). La mezcla de reacción se calentó durante 3-4 días a 65°C . El progreso de la reacción se monitorizó utilizando LC-MS analítica. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se concentró en el rotovapor hasta aproximadamente 2 ml. La mezcla bruta concentrada se purificó por HPLC preparativa. Todas las fracciones deseadas se agruparon y se concentraron en el rotovapor para proporcionar el producto deseado (los detergentes iónicos Dt1, Dt3, Dt5, Dt7, Dt9, Dt11, Dt12). Este producto se sometió luego a reacción de hidrólisis utilizando NaOH 2N. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente hasta que se consumió todo el material de partida tal como se observó en la LC-MS analítica, seguido de neutralización con Amberlite® para obtener los productos zwitteriónicos finales Dt2, Dt4, Dt6, Dt10 y el producto aniónico Dt8 como se muestra más adelante:



5

10

15

y

20

en el que n es como se ha descrito en el presente documento anteriormente. En ciertas realizaciones, cada n es independientemente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30.

Dt1 y Dt2 se probaron para determinar su capacidad para soportar la amplificación de ácido nucleico mediante una polimerasa. Dos dianas de ácido nucleico diferentes de 1 kb y 3 kb (Rhod-1043 y Rhod-3637, respectivamente) se amplificaron mediante PCR utilizando Taq polimerasa en presencia de 0,1 de NP-40 y 0,1 % de Tween® 20 (reacciones de control), Dt1 o Dt2. Como se muestra en la **Figura 1**, tanto Dt1 como Dt2 soportaron las reacciones de amplificación de manera comparable a NP-40/Tween® 20. Dt1 admitió la amplificación del amplicón de 1 kb (Rhod-1043) y el amplicón de 3 Kb (Rhod-3637) cuando se incluyó en la reacción de 50 µl a una concentración de entre el 0,008 % y el 0,0006 %. Dt2 soportó la amplificación del amplicón de 1 Kb (Rhod-1043) y el amplicón de 3 kb (Rhod-3637) cuando se incluyó en la reacción de 50 µl a una concentración de entre el 0,04 % y el 0,0001 % (se observó cierta amplificación al 0,0008 %).

Dt1 también se probó utilizando cebadores de gen de rodopsina para amplificar amplicones de aproximadamente 4 Kb (Rhod-3920, Rhod-4181 y Rhod-4089) (**Figura 2**; "Almacenamiento B": Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, glicerol al 50 %, DTT 1 mM, agua destilada). Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante dos minutos; 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, cuatro minutos 30 segundos a 72 °C; y prolongación durante diez minutos a 72 °C. Dt1 soportó la amplificación de Rhod-3920 y Rhod-4181 cuando se incluyó en la reacción de 50 µl en una concentración de entre el 0,008 % y el 0,001 %. Dt1 soportó la amplificación de Rhod-4089 cuando se incluyó en la reacción de 50 µl a una concentración de entre el 0,008 % y el 0,001 %.

La **Figura 3** muestra que el 0,004 % y el 0,002 % de Dt1 es comparable al 0,004 % de NP-40/Tween® 20 en la amplificación de amplicones de 0,1 a 1 Kb. La **Figura 4** muestra que 0,004 % y 0,002 % de Dt1 es comparable a 0,004 % de NP-40/Tween® 20 en amplificación de amplicones de 1-2 kb.

La **Figura 5** proporciona una comparación entre Brij-58 y Dt1. Como se muestra allí, Dt1 (0,04 % a 0,006 %) soporta la amplificación de una manera comparable a Brij-58 (0,04 % a 0,0004 %) o NP40/Tween® 20 (0,002 %). Los datos indican que esto no se debió a la contaminación del material de partida Brij-58 utilizado para la modificación.

La **Figura 6** compara la actividad de Dt1 y Dt2. Como se muestra en el presente documento, ambos detergentes modificados soportan la amplificación. Se muestra que Dt1 soporta la amplificación cuando se incluye en la mezcla de reacción a una concentración de entre 0,04 % y 0,001 %. Se muestra que Dt2 soporta la amplificación cuando se incluye en la mezcla de reacción a una concentración de entre 0,04 y 0,006 %.

Las **Figuras 7 y 8** brindan una comparación entre Dt4 y Tween® 20 al amplificar cuatro objetivos diferentes (B2M, GAPDH, RPLPO y GUSB). Como se muestra, la amplificación en presencia de 0,01 % de Dt4 o 0,01 % de Tween® 20 proporcionó resultados similares.

La **Figura 9** proporciona una comparación entre Dt4 y Tween® 20 al amplificar varios objetivos diferentes. Como se muestra, la amplificación en presencia de Dt4 o Tween® 20 proporcionó resultados similares.

La **Figura 10** ilustra los resultados de la amplificación en presencia de Dt1, Dt3, Dt5, Dt6 y Dt7. Como se muestra, la amplificación fue soportada por cada detergente en el nivel más alto por Dt4 seguido de Dt1, aunque, en las condiciones de reacción de estos experimentos. Dt5 y Dt7 mostraron una actividad similar, seguido de Dt6.

Las **Figuras 11 a 15** muestran gráficos de amplificación que comparan la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 a diversas concentraciones al amplificar HPRT1 o PPIA. Como se muestra, Dt4 soporta la reacción de amplificación de una manera comparable a Brij-58 y Tween® 20 en todas las concentraciones probadas (0,001 % a 0,0001 %).

Las **Figuras 16-18** ilustran que Dt4 se puede usar a una concentración más baja que Tween® 20 en diversas reacciones (por ejemplo, 0,002 % de Dt4 en comparación con 0,01 % de Tween® 20).

Las **Figuras 19 y 20** demuestran que Dt4 es estable (por ejemplo, conserva su capacidad de soportar la amplificación) en un tampón "5X" (Tris (pH 8,0), KCl y BSA) durante al menos dos meses.

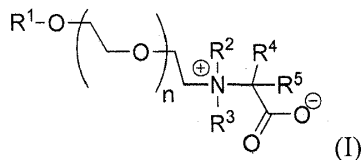
Las **Figuras 21 y 22** proporcionan una comparación de la capacidad de dos lotes diferentes de Dt4 para soportar la amplificación de varios objetivos, en comparación con Tween® 20.

La **Figura 23** ilustra que Dt4 soporta la amplificación a través de diversos ensayos TaqMan®.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una polimerasa y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de Fórmula I:

5



en la que:

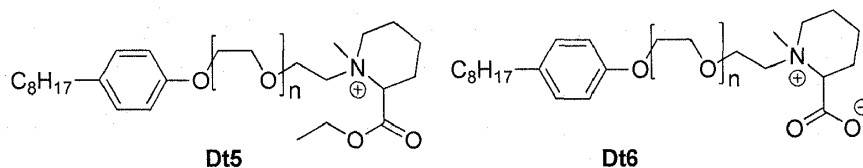
10 R¹ es H, alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, donde el arilo sustituido o el fenilo sustituido están sustituidos con al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀) o heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido;

15 R² y R³ son cada uno independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂(C₆H₅) o C(CH₃)₃;

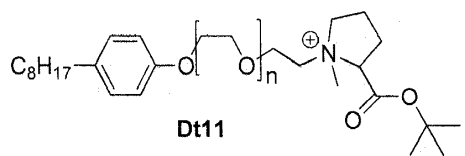
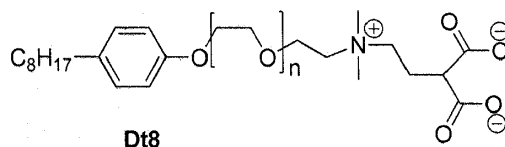
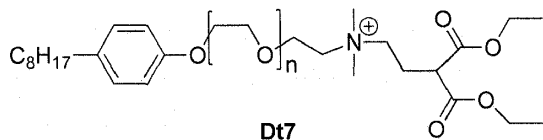
15 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, C₆H₅, CH₂(C₆H₅), C(CH₃)₃, CH₂CH(CH₃)₂, CHCH₂CH(CH₃)₂, CH₂C₆H₅OH, CH₂C=CH NH(C₆H₅), CH₂C=CHN=CHNH, CH₂COOH, CH₂CONH₂, (CH₂)₂CONH₂, (CH₂)₂COOH, CH₂SH, (CH₂)_nNH, (CH₂)_nN, CH₂OH, CH(OH)CH₃, (CH₂)₂SCH₃, (CH₂)₃NHC(NH₂)=NH, o, como alternativa, R⁴ se toma junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros que está sustituido opcionalmente con al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido; y

20

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30; y

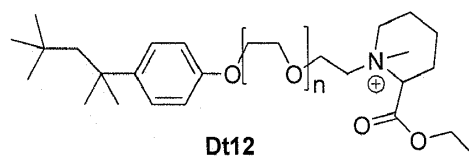


25



30

y



35

2. La composición de la reivindicación 1, en la que:

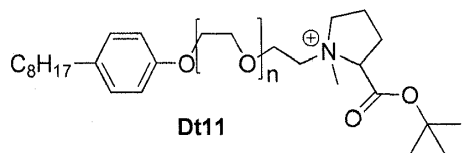
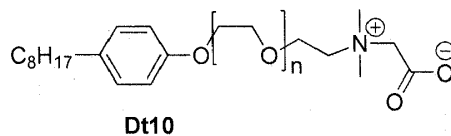
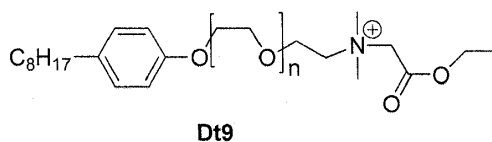
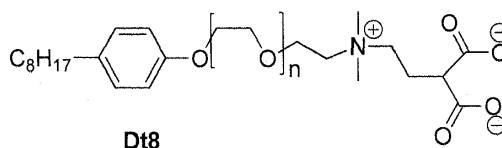
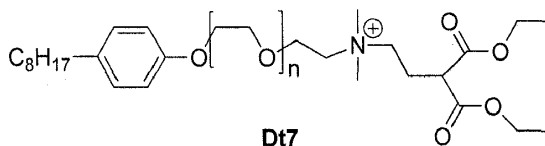
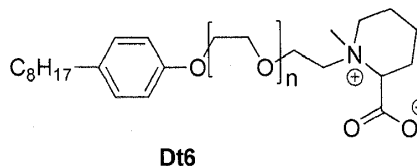
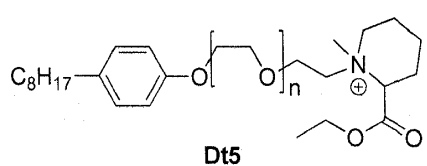
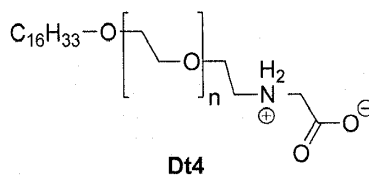
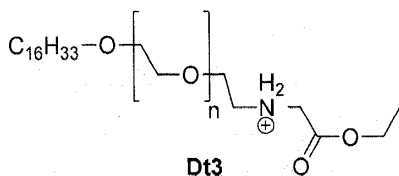
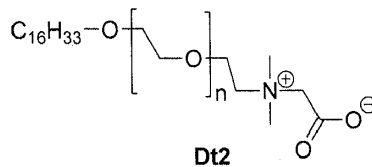
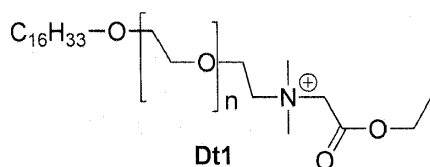
R¹ es alquilo (C₈-C₁₆) o alquilo (C₈-C₁₆) sustituido;

R² y R³ son cada uno independientemente H o -CH₃;

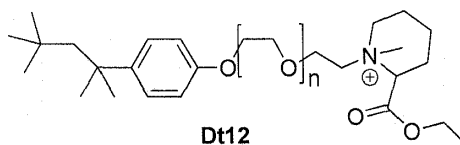
R⁴ y R⁵ son cada uno de forma independiente H, (CH₂)_nNH, (CH₂)_nN, o, como alternativa, R⁴ se toma junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros que está sustituido opcionalmente con al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido; y

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30,

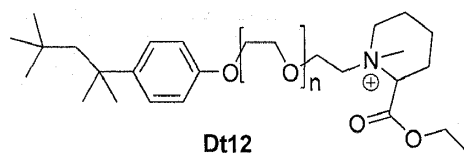
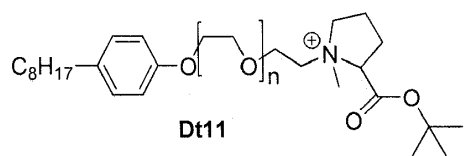
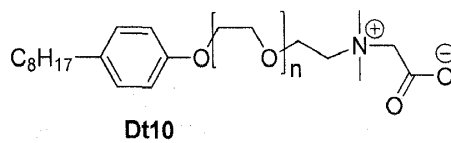
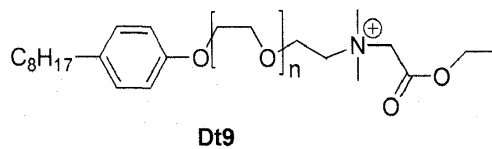
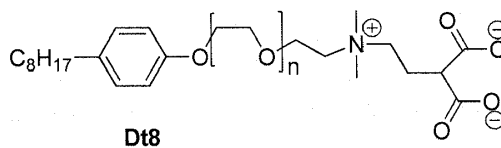
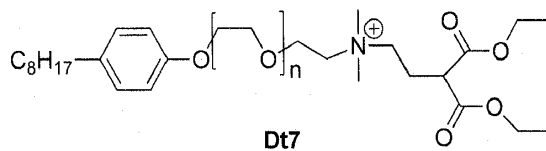
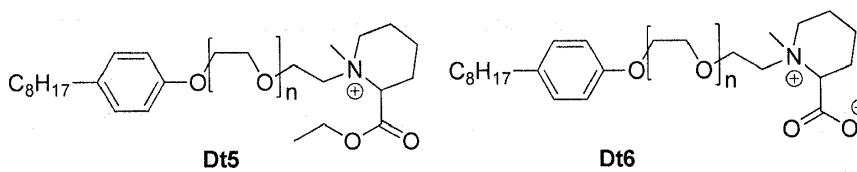
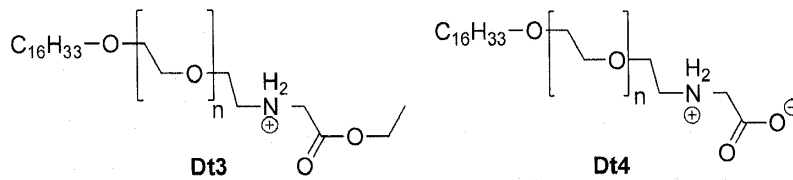
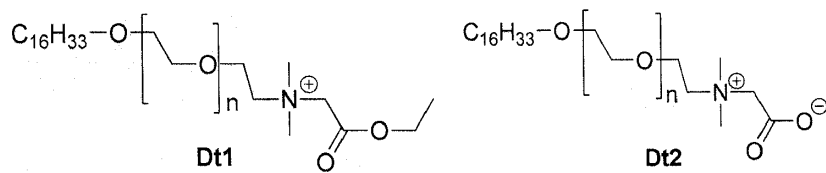
o en donde el compuesto se selecciona de:



y



- 5 3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha polimerasa es termoestable.
4. Un kit que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la composición es una composición de almacenamiento o de reacción.
- 10 5. Un método para aumentar la eficiencia de una polimerasa, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) mezclar un ácido nucleico diana con al menos una polimerasa, al menos un cebador, dNTP y al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1;
- b) amplificar dicho ácido nucleico diana,
- 15 preferentemente, en el que dicha eficiencia aumentada es igual o mayor que la eficiencia cuando la polimerasa está en presencia de nonilfenoxipolietoxietanol o polioxietileno (20) monolaureato de sorbitán en lugar de dicho compuesto.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que la concentración efectiva de dicho detergente es al menos de una a diez veces menor que la requerida por los detergentes convencionales.
- preferentemente en el que dicho detergente convencional es nonilfenoxipolietoxietanol o polioxietileno (20) sorbitán monolaureato y/o en el que dicho detergente es estable en un tampón 5X durante al menos 2 meses.
- 25 7. Un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) formar una mezcla de reacción que comprende al menos una polimerasa, al menos un cebador, varios dNTP, al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1 y un marcador detectable;
- b) amplificar dicho ácido nucleico diana; y
- c) detectar una señal generada a partir de dicho marcador detectable indicativo de la presencia y/o la cantidad de dicho ácido nucleico diana en dicha muestra.
- 30 8. Un método para inhibir la inactivación de una polimerasa en un proceso de ciclo térmico, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha polimerasa con un compuesto como se define en la reivindicación 1 durante el proceso de ciclado térmico.
- 35 preferentemente, en el que dicha inhibición de la inactivación de la polimerasa es igual o mayor que la inhibición de la inactivación de la polimerasa cuando la polimerasa está en presencia de nonilfenoxipolietoxietanol o polioxietileno (20) sorbitán monolaureato en lugar de dicho compuesto.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que dicha polimerasa es termoestable.
10. Una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende:
- a) al menos una polimerasa;
- b) dNTP; y
- c) al menos un compuesto como se define en 1,
- 45 preferentemente en donde dicha polimerasa es termoestable.
- 50 11. Un método para polimerizar o amplificar un ácido nucleico diana, que comprende las etapas de:
- a) combinar el ácido nucleico diana con al menos una polimerasa y al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1 en una mezcla de reacción; y
- b) polimerizar el ácido nucleico diana,
- 55 preferentemente en donde el compuesto se selecciona de:



5

10

15

y

20

12. El método de la reivindicación 11, en el que la mezcla de reacción comprende además al menos un cebador de ácido nucleico y varios dNTP.

13. El método de la reivindicación 11, en el que se detecta la polimerización o la amplificación del ácido nucleico diana, preferentemente en el que la polimerización o la amplificación del ácido nucleico diana se detecta utilizando un marcador detectable, más preferentemente en el que el marcador detectable es parte de un cebador o de una sonda.

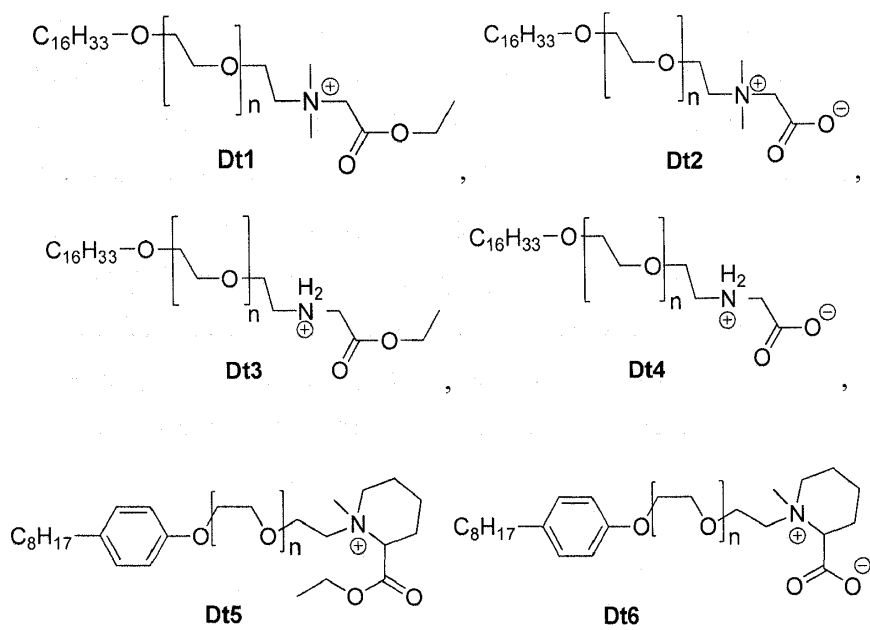
14. El método de la reivindicación 13, en el que se cuantifica la polimerización o la amplificación del ácido nucleico diana.

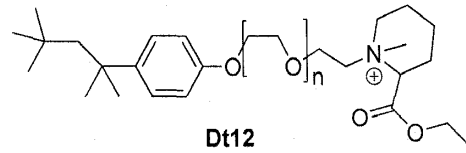
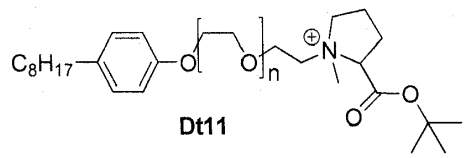
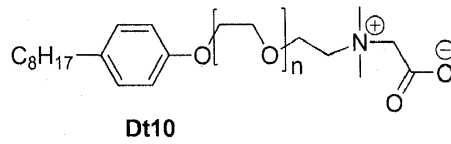
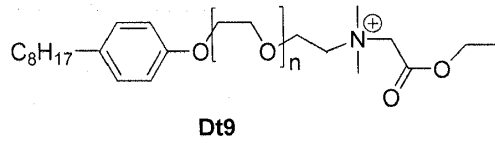
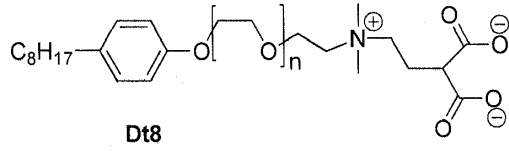
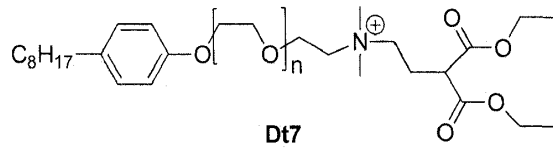
15. El método de la reivindicación 11, en el que la polimerasa se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa T7, ADN polimerasa mitocondrial eucariótica γ , ADN polimerasa procariótica I, ADN polimerasa procariótica II, ADN polimerasa procariótica III, ADN polimerasa procariótica IV, ADN polimerasa procariótica V, polimerasa eucariótica α , polimerasa eucariótica β , polimerasa eucariótica γ , polimerasa eucariótica δ , polimerasa eucariótica ϵ , polimerasa eucariótica η , polimerasa eucariótica ζ , polimerasa eucariótica ι , polimerasa eucariótica κ , ADN polimerasa de *E. coli*, ADN polimerasa subunidad alfa III de *E. coli*, ADN polimerasa III subunidades épsilon de *E. coli*, polimerasa A IV de *E. coli*, polimerasa V de *E. coli*, ADN polimerasa I de *T. aquitatus*, ADN polimerasa I de *B. stearotherophilus*, una polimerasa de *Euryarchaeota*, desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), polimerasa 4 de *S. cerevisiae*, una polimerasa de síntesis translesión, transcriptasa inversa, una polimerasa termoestable y telomerasa, opcionalmente, en donde la polimerasa termoestable se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa de *Taq*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Pfu* y ADN polimerasa Vent™, una polimerasa que tiene una actividad de exonucleasa reducida de 3' a 5', ADN polimerasa SuperScript™, una ADN polimerasa genéticamente modificada, una polimerasa que tiene la mutación del sitio activo F667Y, una polimerasa que tiene el equivalente del sitio activo F667Y, polimerasa *Tth*, AmpliTaq®FS, ThermoSequenase™, ThermoTerminator I, ThermoTerminator II, ThermoTerminator III, ThermoTerminator Gamma, un derivado del mismo, y un fragmento del mismo.

16. Un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método:

- a) formar una mezcla de reacción que comprende al menos una polimerasa, al menos un cebador, varios dNTP, y al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1, y un marcador detectable;
- b) amplificar dicho ácido nucleico diana; y
- c) detectar una señal generada a partir de dicho marcador detectable indicativo de la presencia de dicho ácido nucleico diana en dicha muestra,

preferentemente en el que el compuesto se selecciona de:

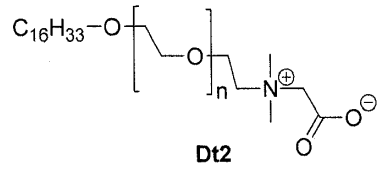
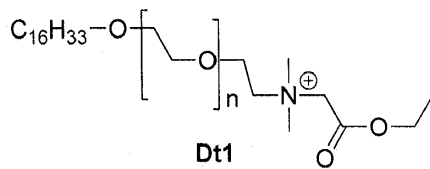




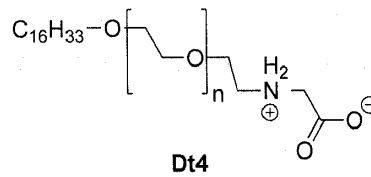
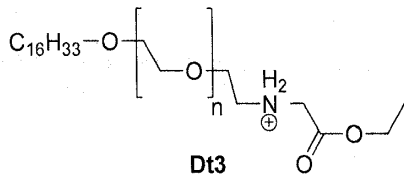
5

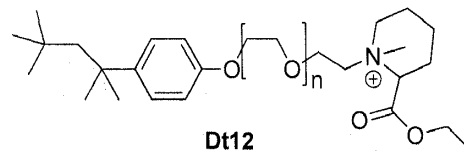
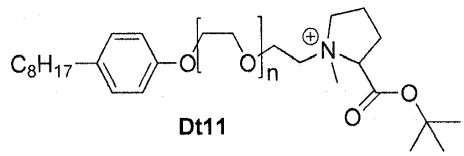
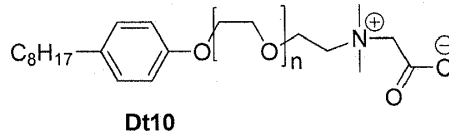
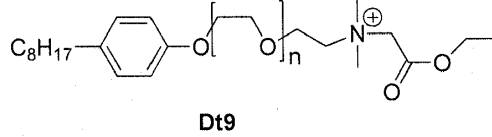
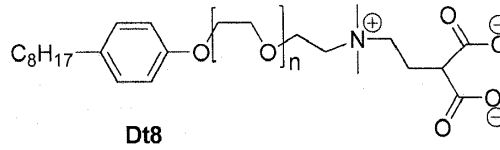
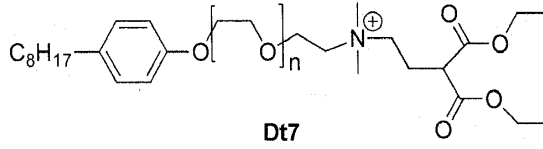
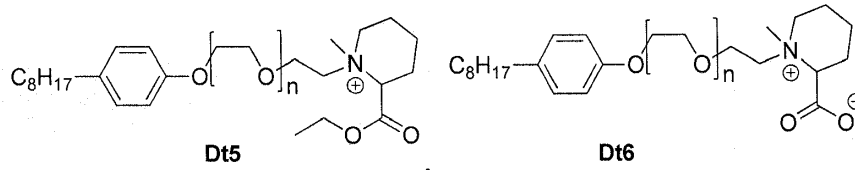
10
y

15 17. Un método para inhibir la inactivación de una polimerasa en un proceso de ciclado térmico al poner en contacto la polimerasa con un compuesto como se define en la reivindicación 1 durante el proceso de ciclado térmico, preferentemente en el que el compuesto se selecciona de:



20





5

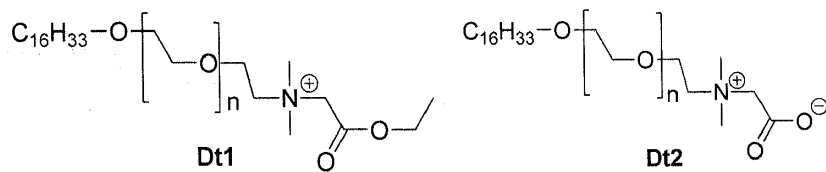
10

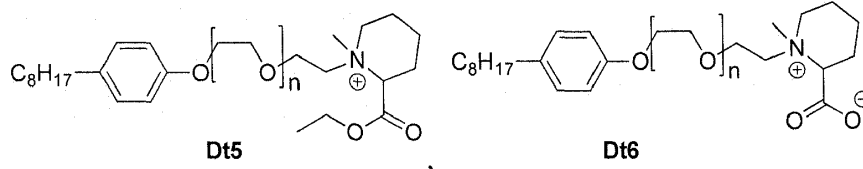
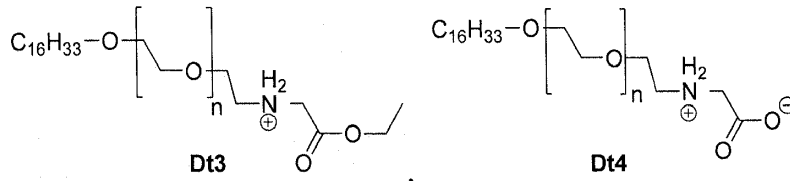
y

15

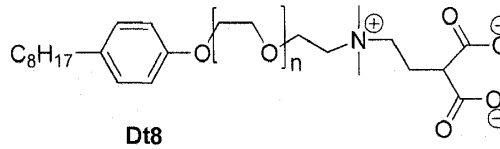
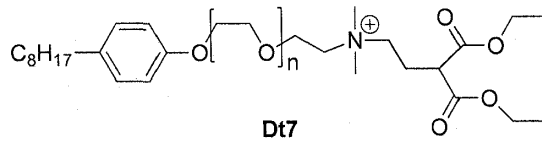
18. Un método que comprende combinar una enzima que tiene actividad polimerasa y dicho compuesto como se define en la reivindicación 1 para formar una mezcla, en condiciones tales que dicha actividad polimerasa de dicha enzima se estabilice,

20 preferentemente en el que el compuesto se selecciona de:

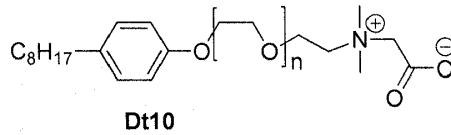
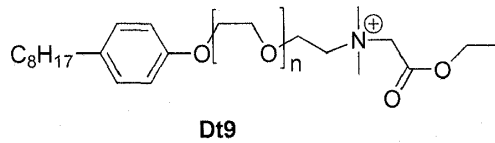




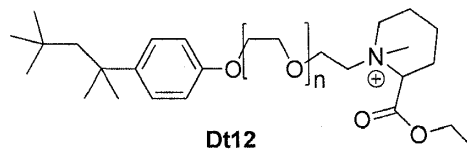
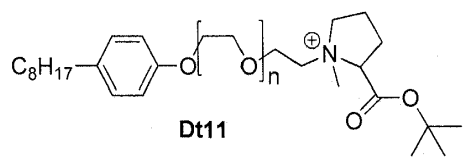
5



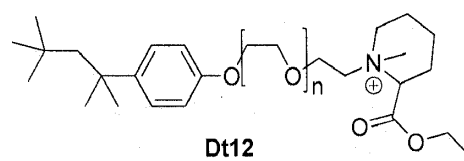
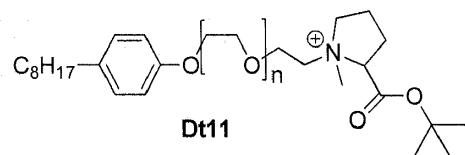
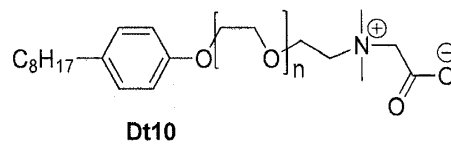
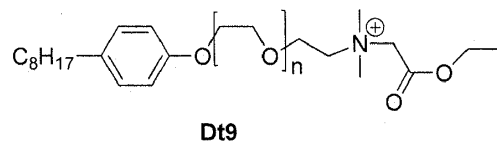
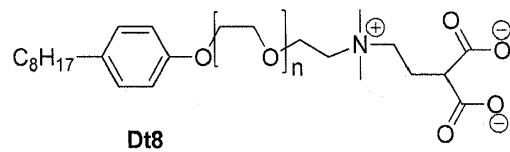
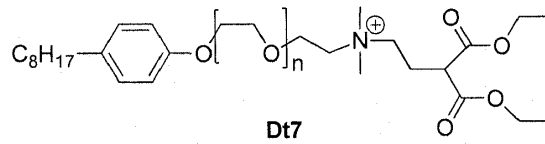
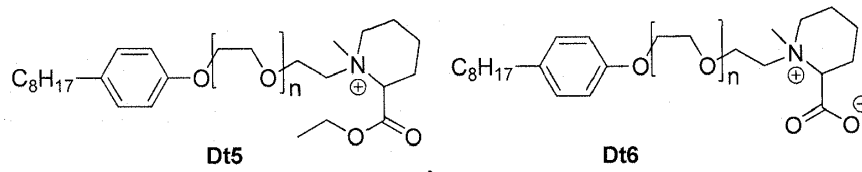
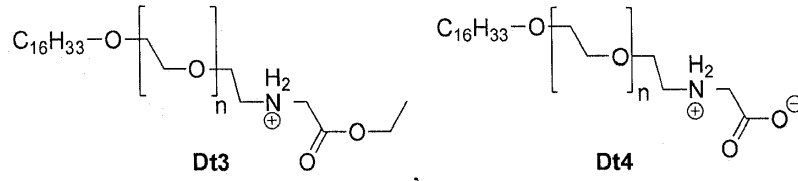
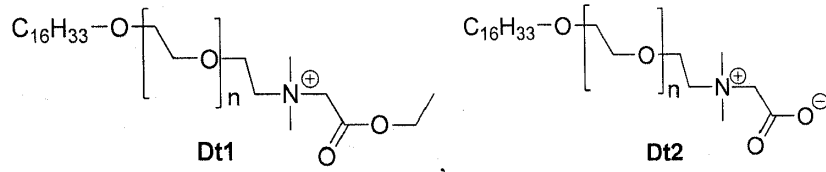
10



15 y



19. Una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende al menos una polimerasa, varios dNTP, al menos un cebador y al menos un compuesto como se define en la reivindicación 1, preferentemente en el que el compuesto se selecciona de:



5

10

15

y

Titulación de Dt1 y Dt2 a 11 concentraciones diferentes usando productos de PCR de 1 Kb y 3 Kb

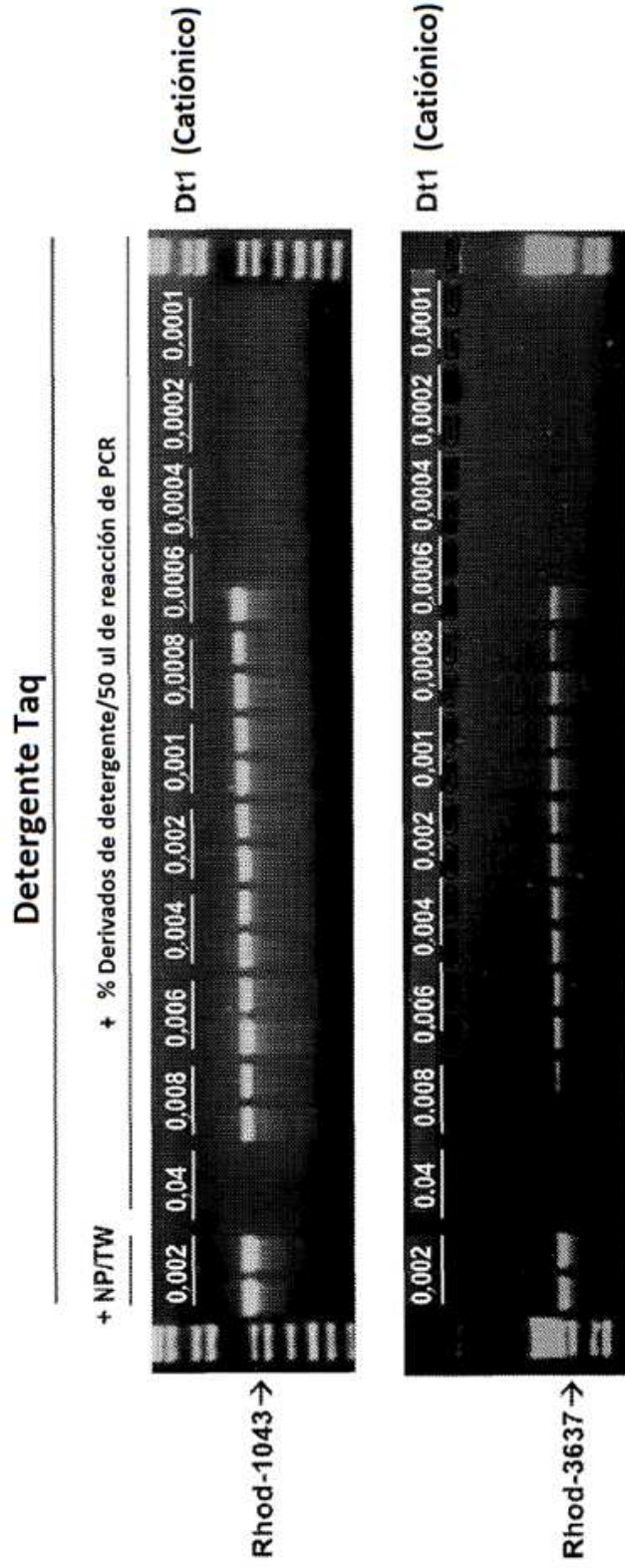


FIG. 1-1

Titulación de Dt1 y Dt2 a 11 concentraciones diferentes usando productos de PCR de 1 Kb y 3 Kb

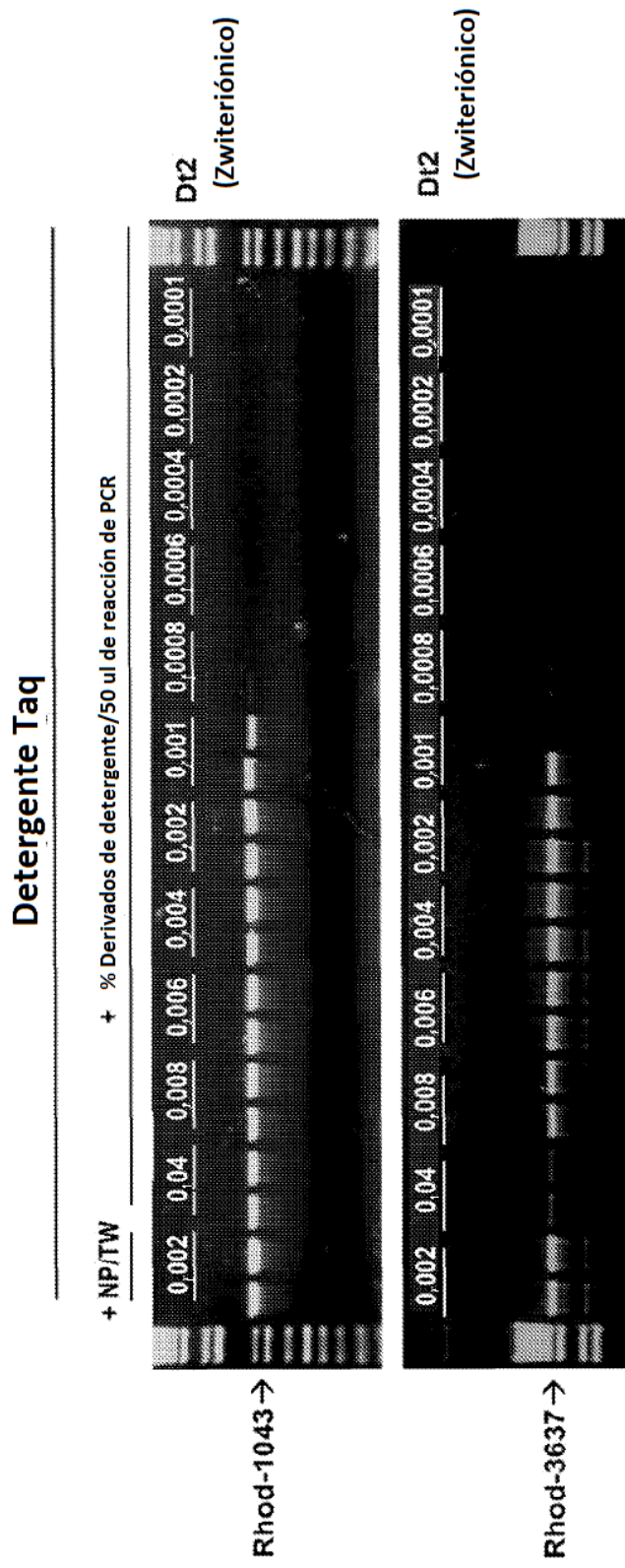
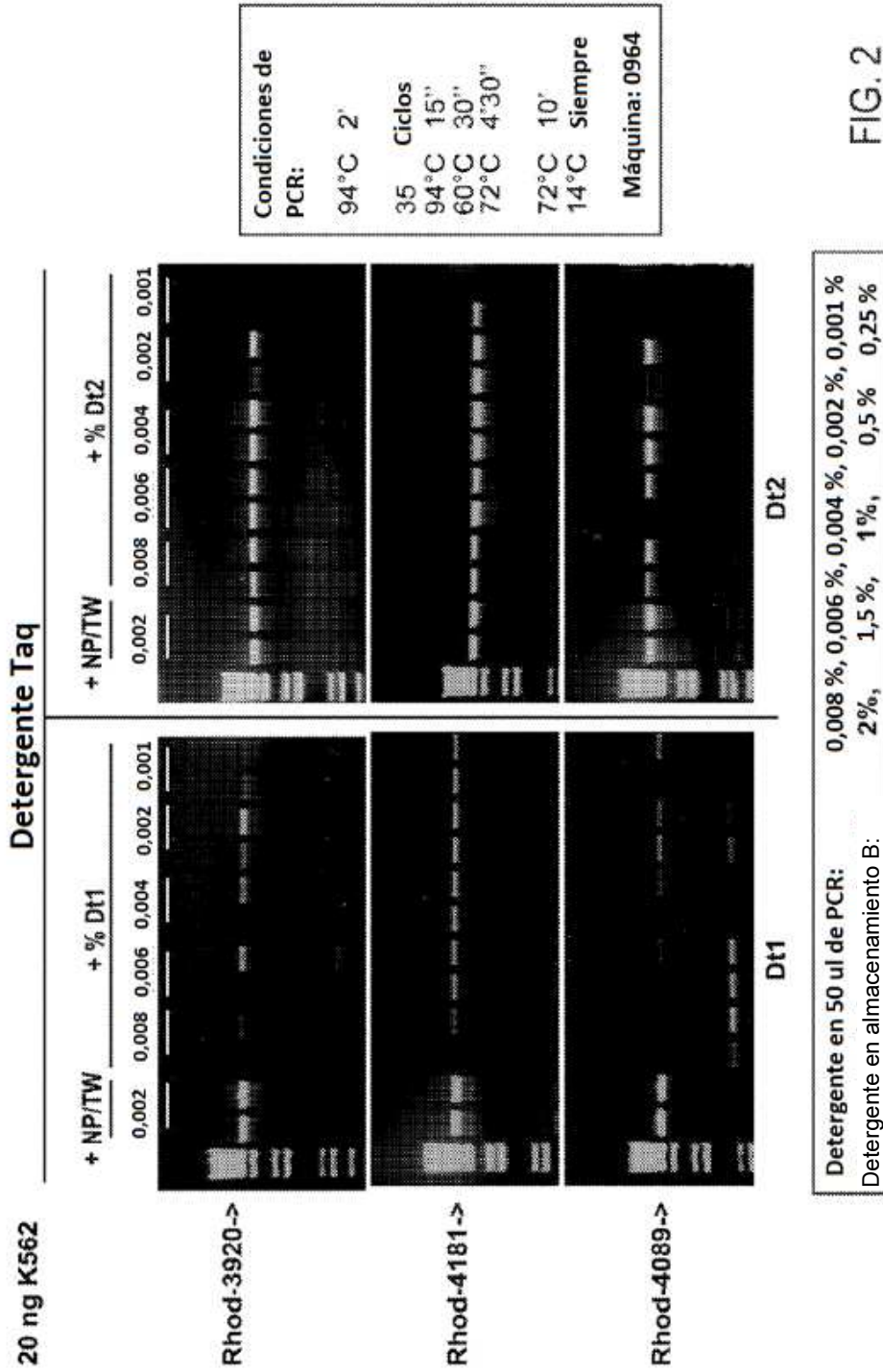


FIG. 1-2

Titulación de Dt1 y Dt2 usando cebador del gen de rodopsina (producto de ~4Kb)



Dt2 a 0,004 % y 0,002 % frente a NP/TW para productos de PCR de 0,1-1 Kb
 gDNA K562 @ 0,5 ng

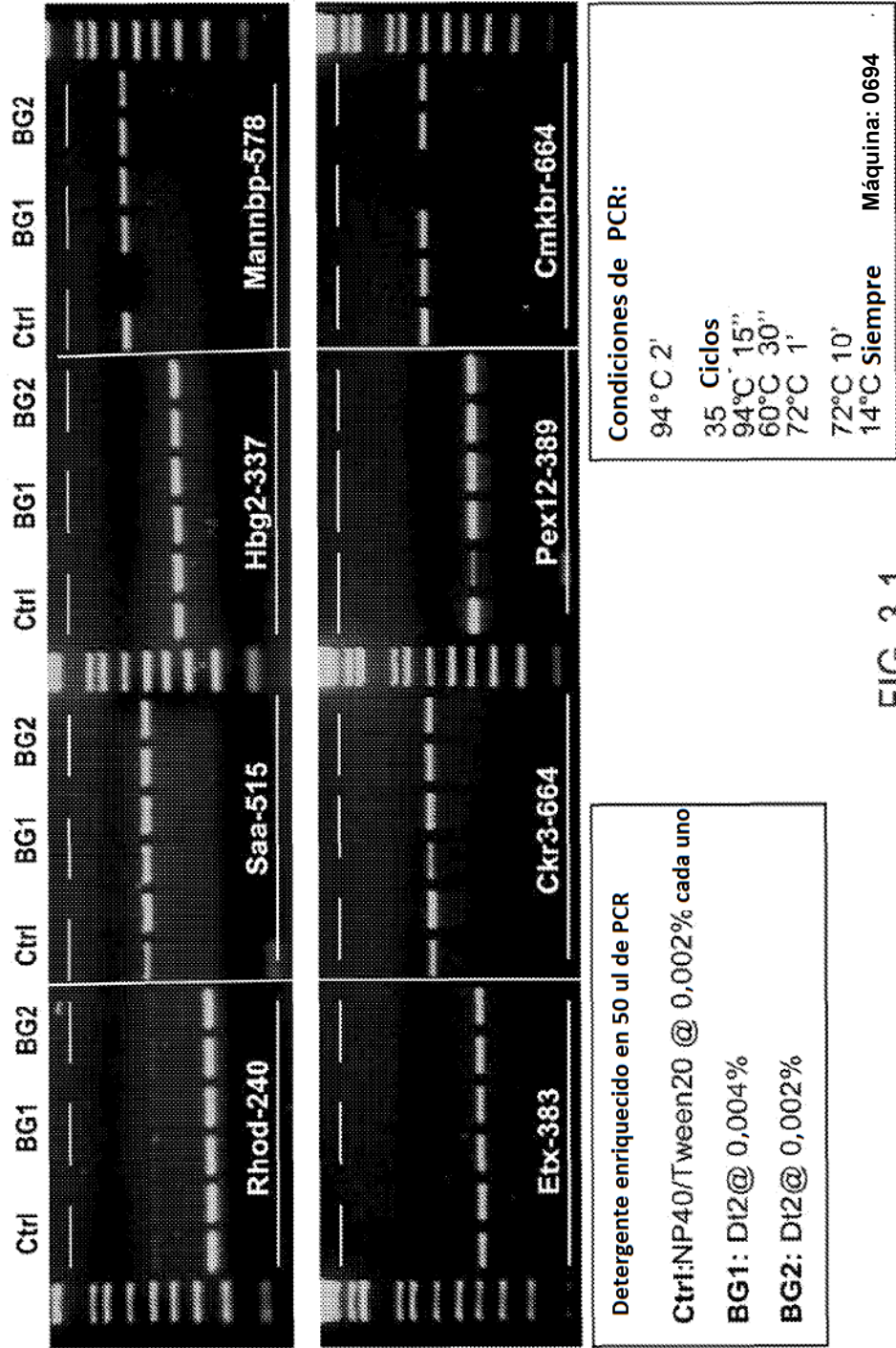


FIG. 3-1

Dt2 a 0,004 % y 0,002 % en comparación con NP/TW para productos de PCR de 0,1-1 kb
gDNA K562 @ a 0,5 ng

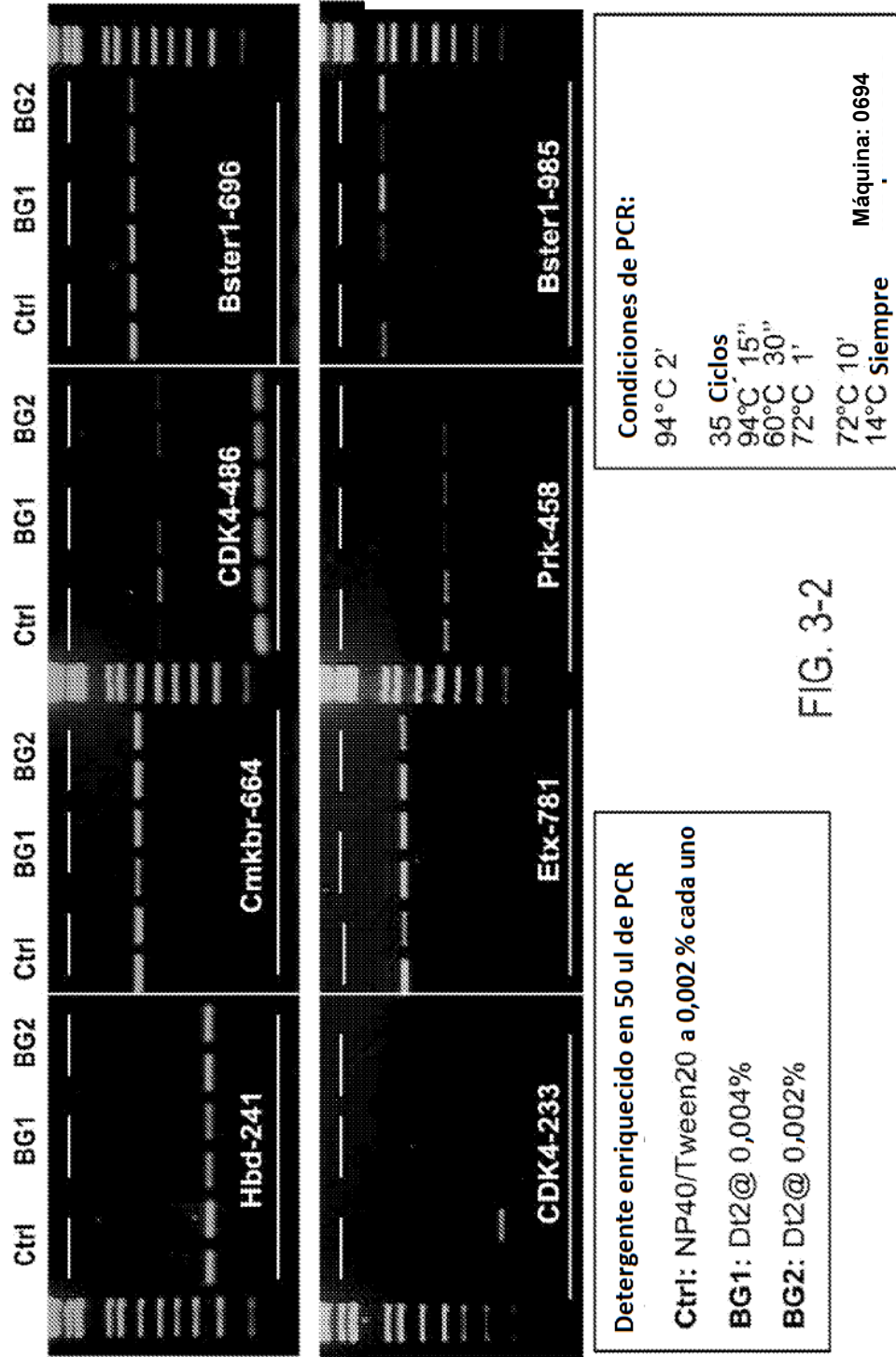


FIG. 3-2

Dt2 a 0,004 % y 0,002 % en comparación con NP/TW para productos de PCR de 0,1-1 kb
gDNA K562 @ 1ng

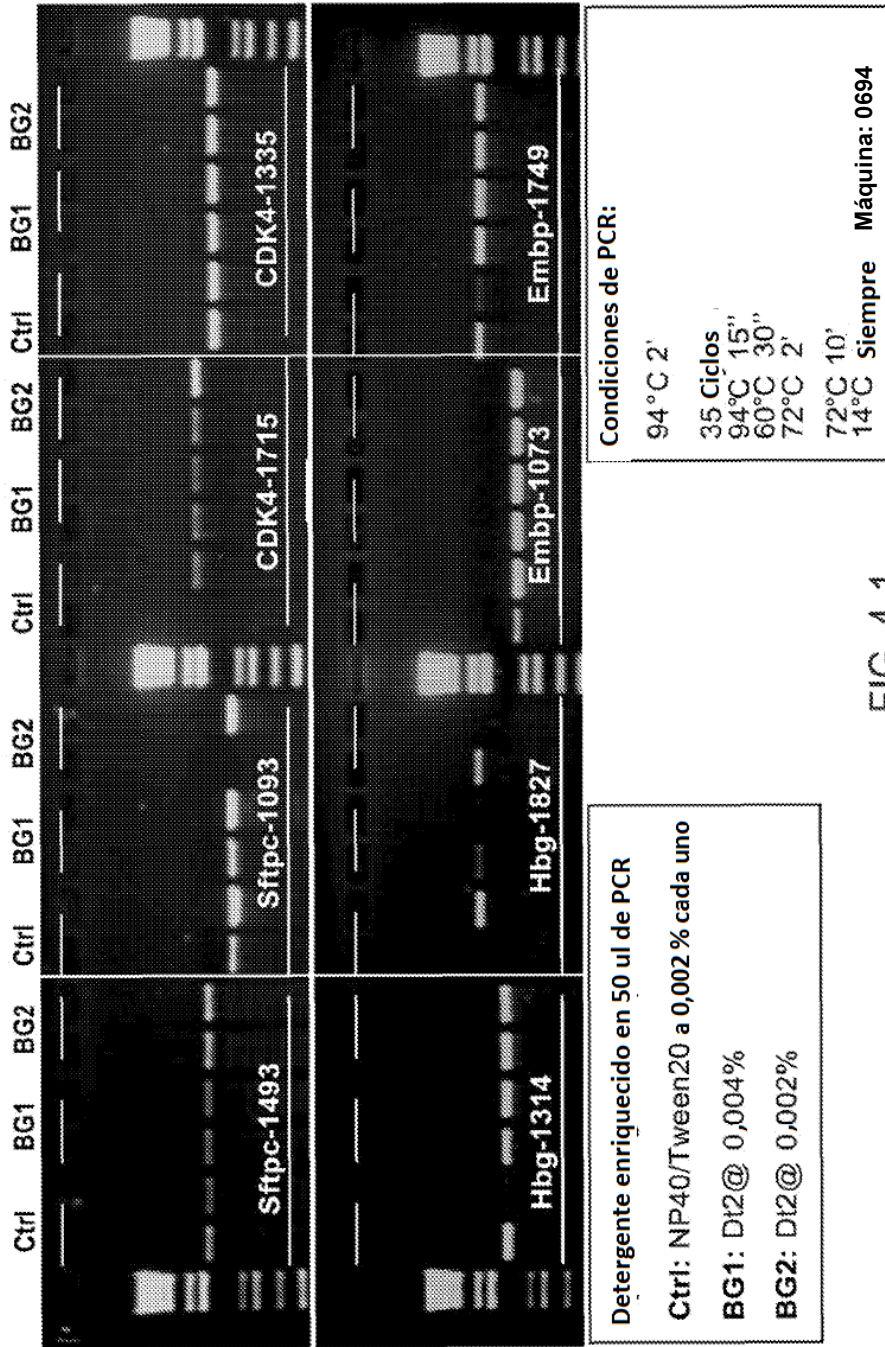


FIG. 4-1

Dt2 a 0,004 % y 0,002 % en comparación con NP/TW para productos de PCR de 0,1-1 kb

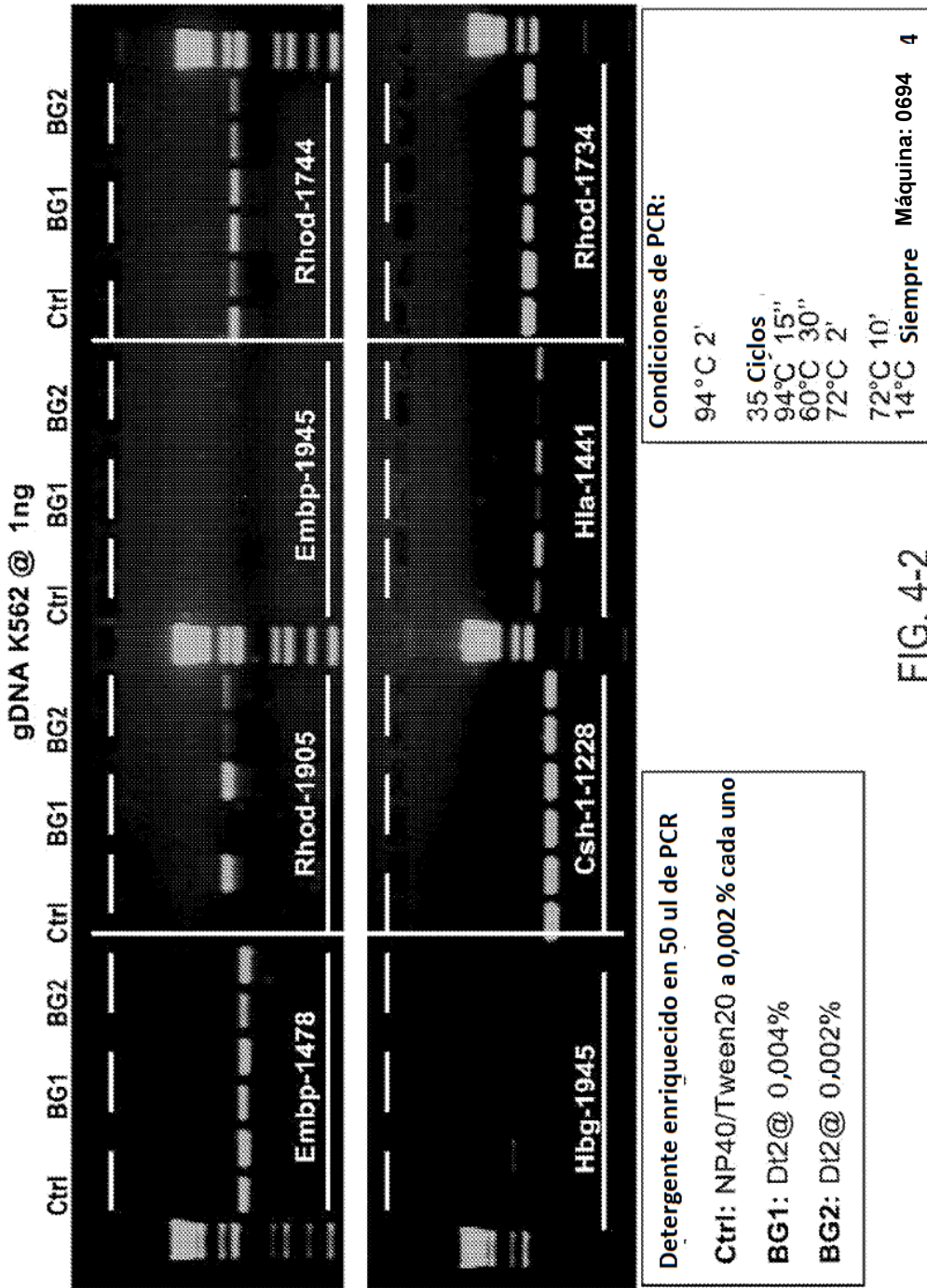


FIG. 4-2

Actividad de PCR: Comparación de Brij58 solo con Dt2

Detergente Taq

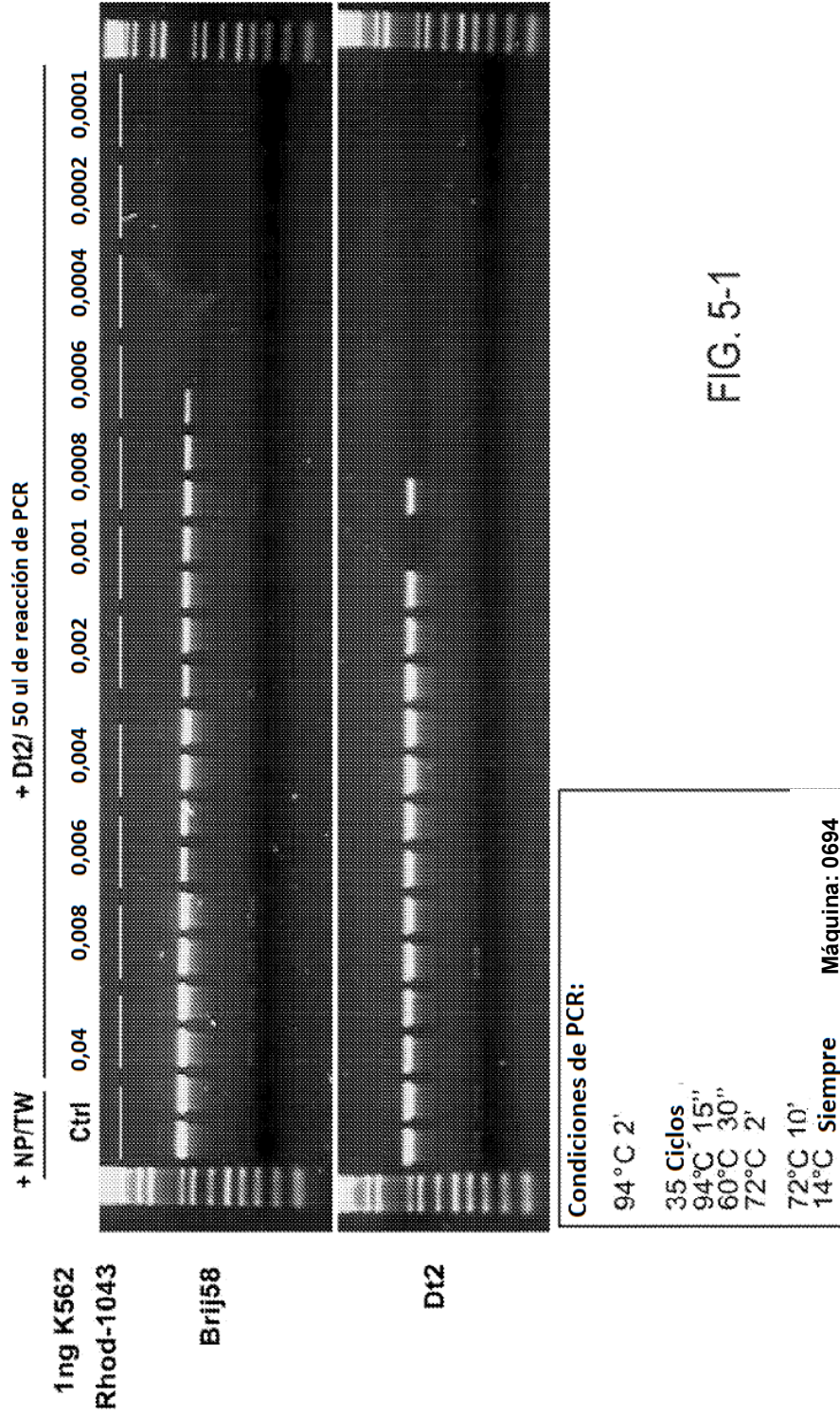
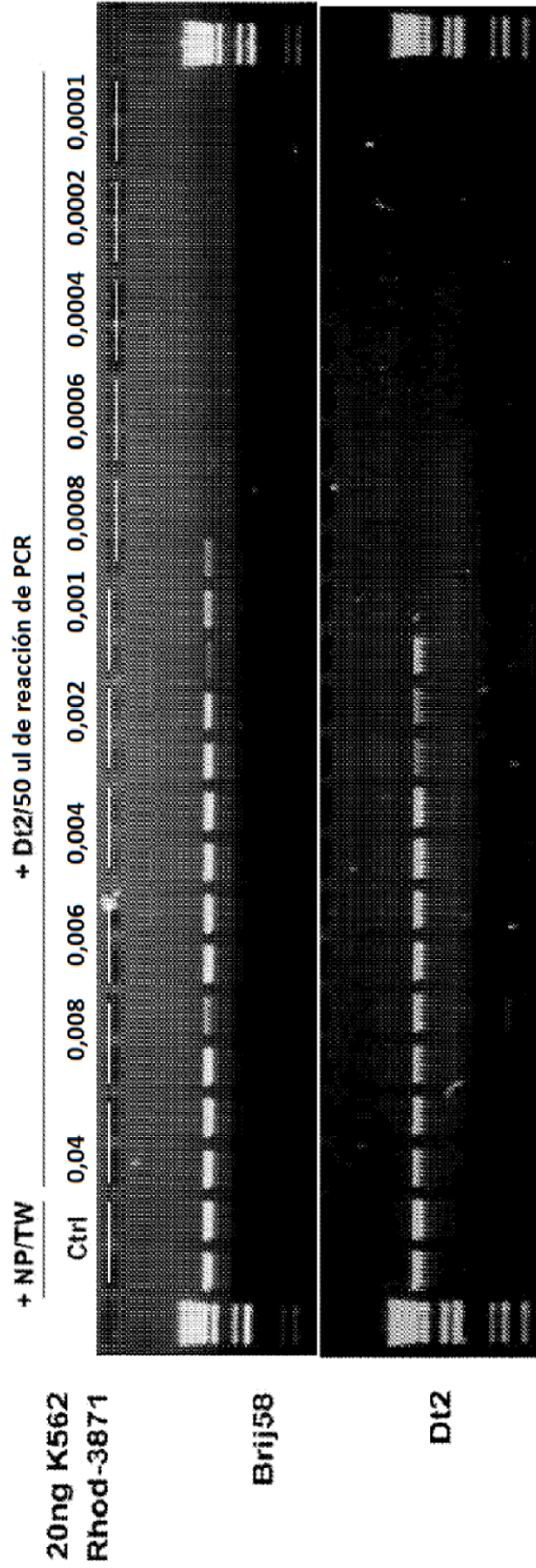


FIG. 5-1

Actividad de PCR: Comparación de Brij58 solo con Dt2

Detergente Taq



Condiciones de PCR:
 94°C 2'
 35 Ciclos
 94°C 15"
 60°C 30"
 72°C 1'
 72°C 10'
 14°C Siempre

Máquina: 0694 |

FIG. 5-2

Titulación de Dt2 y Dt4 usando rodopsina-1043

Taq-det

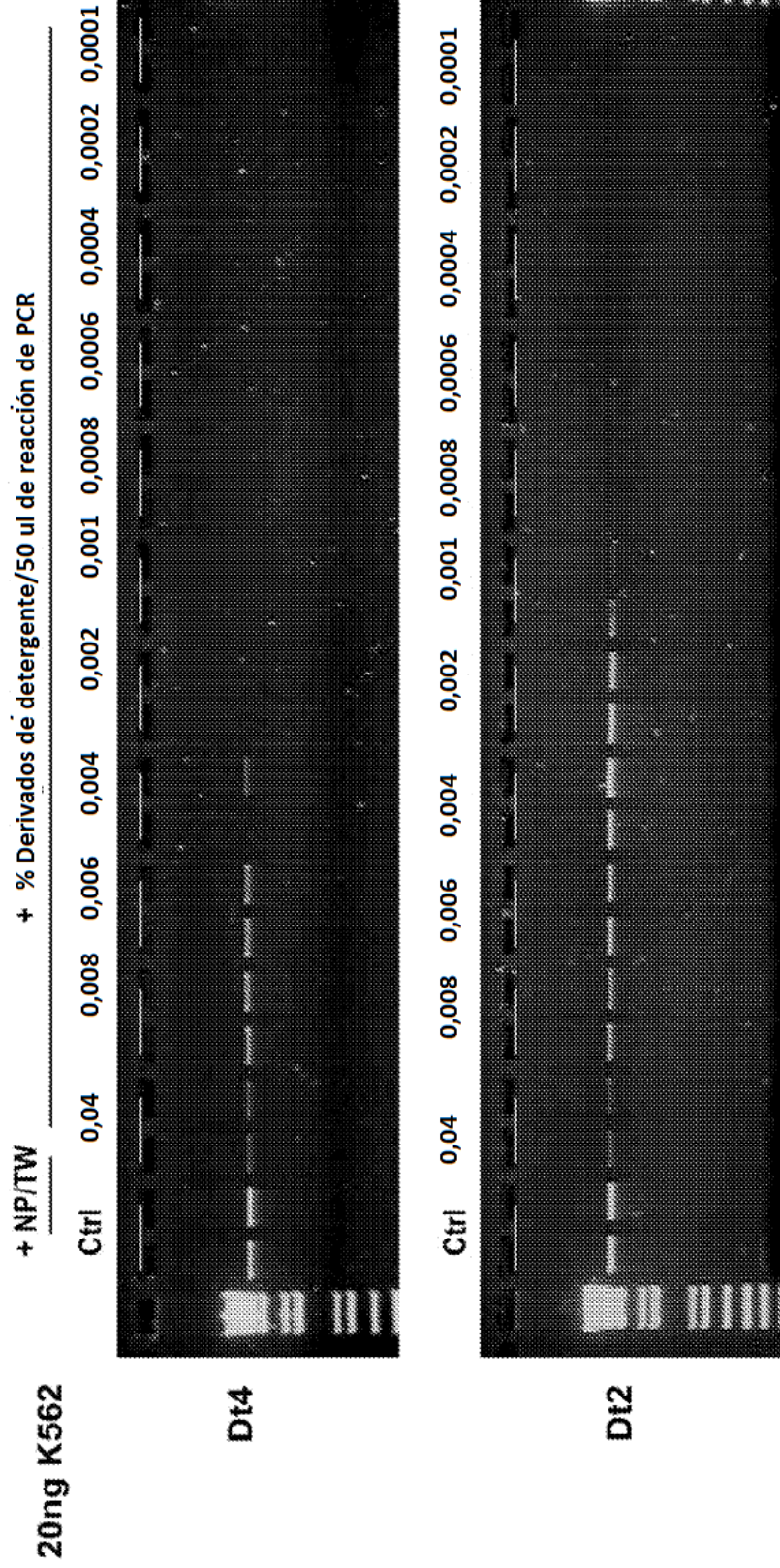


FIG. 6

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20
Gráfico de amplificación

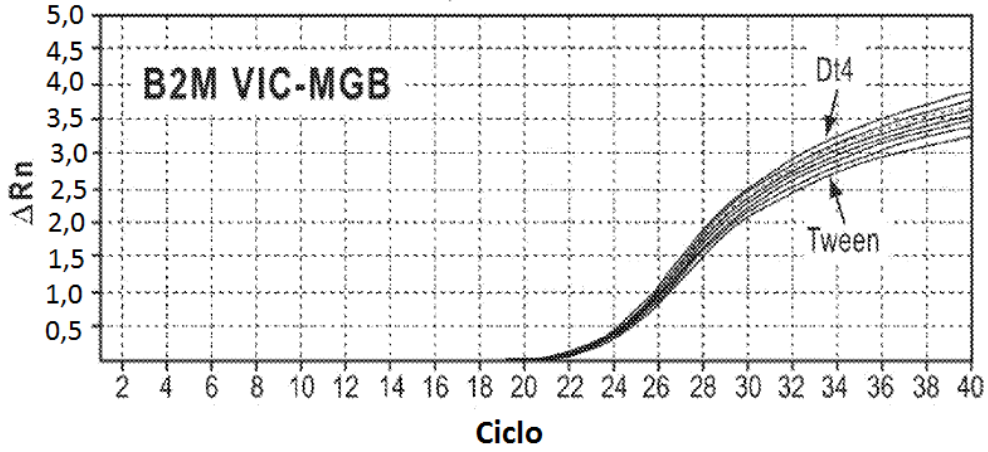


FIG. 7-1

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20
Gráfico de amplificación

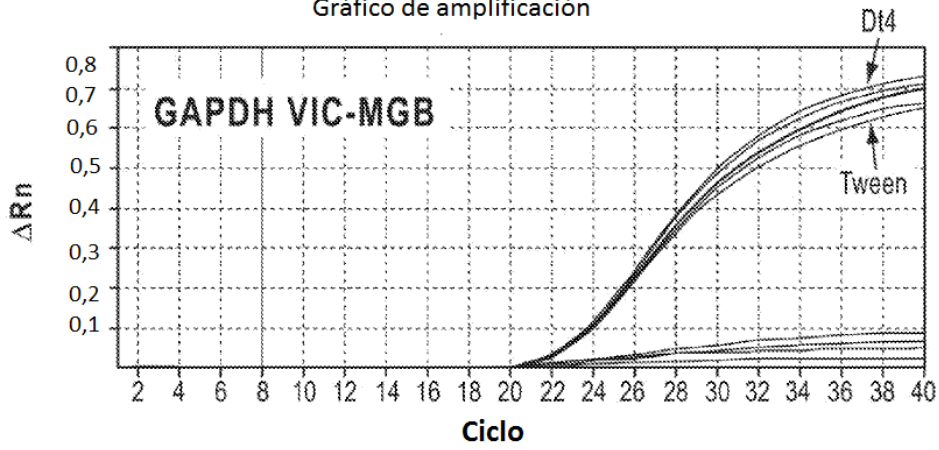


FIG. 7-2

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20
Gráfico de amplificación

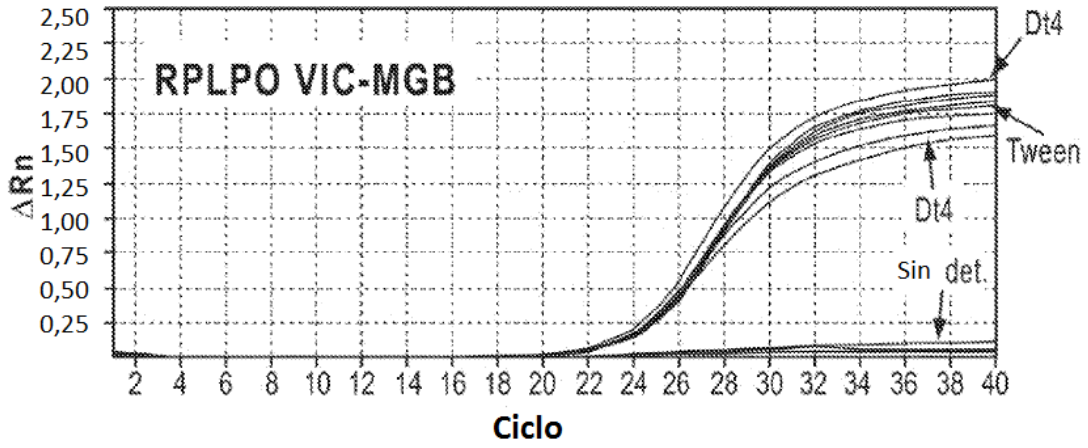


FIG. 7-3

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20
Gráfico de amplificación

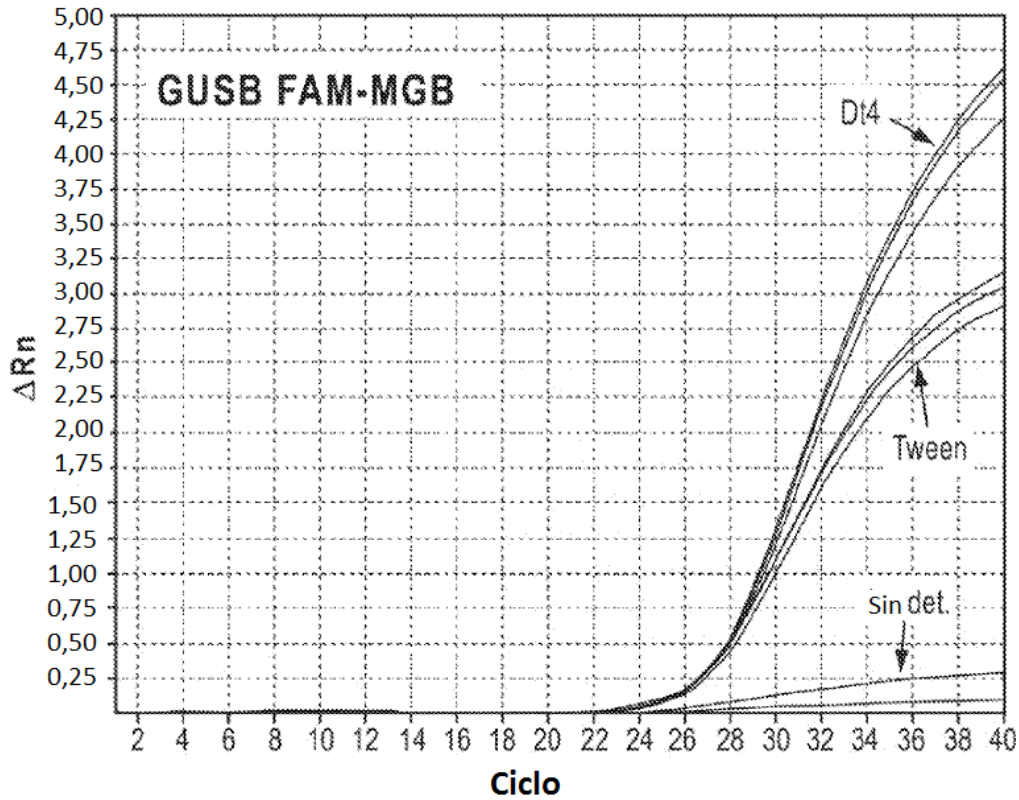


FIG. 7-4

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20 Escala log
Gráfico de amplificación

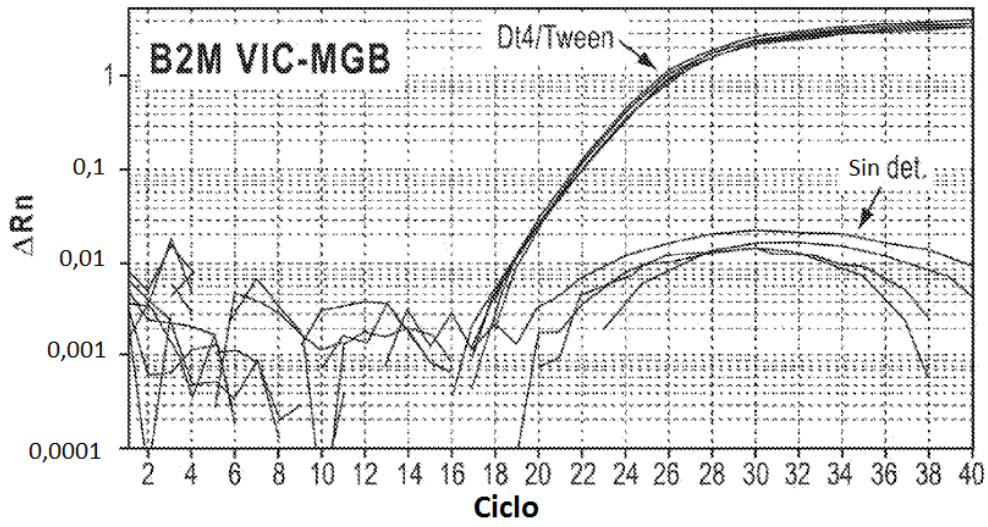


FIG. 8-1

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20 Escala log
Gráfico de amplificación

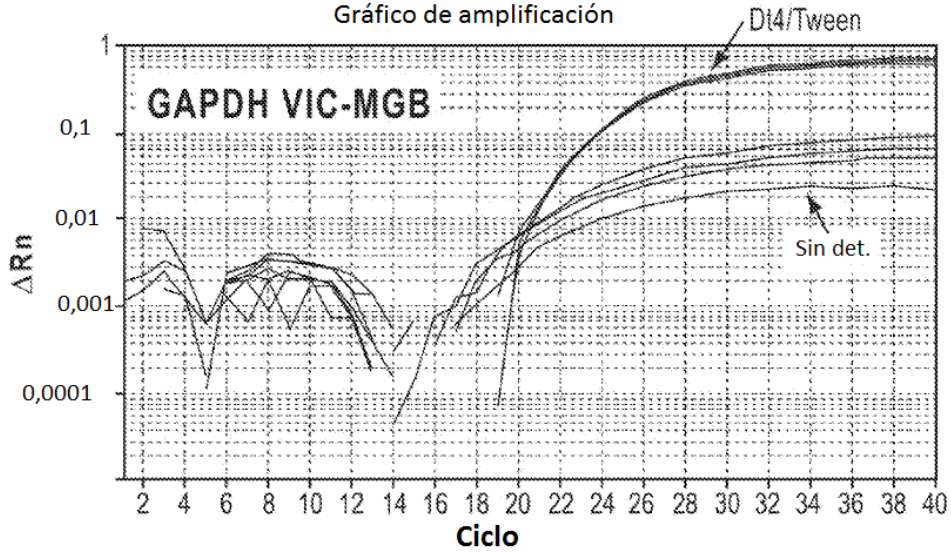


FIG. 8-2

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20 Escala log

Gráfico de amplificación

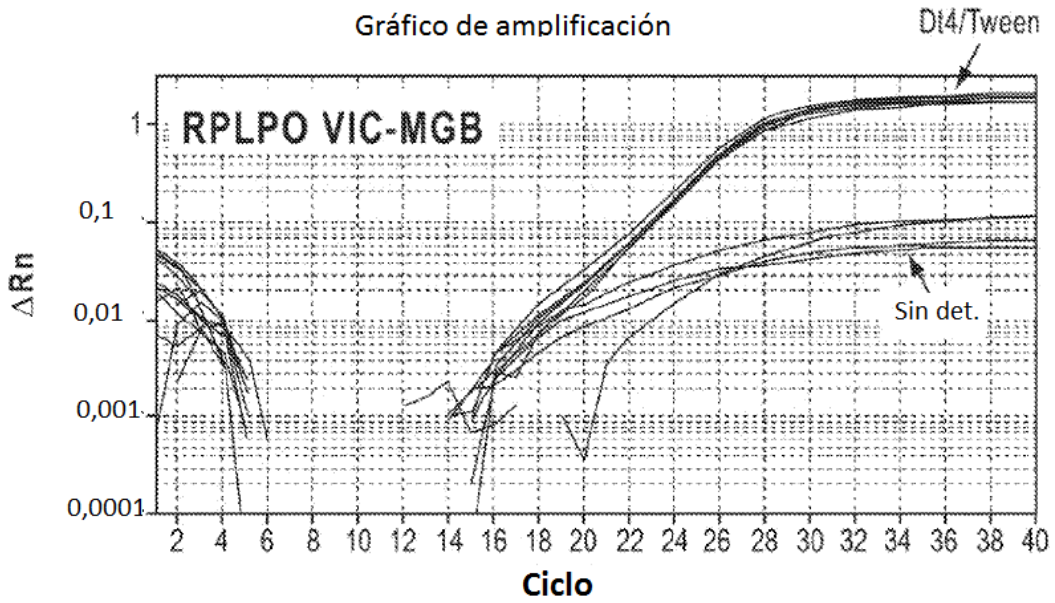


FIG. 8-3

Derivado del detergente DT4 en comparación con Tween 20 Escala log

Gráfico de amplificación

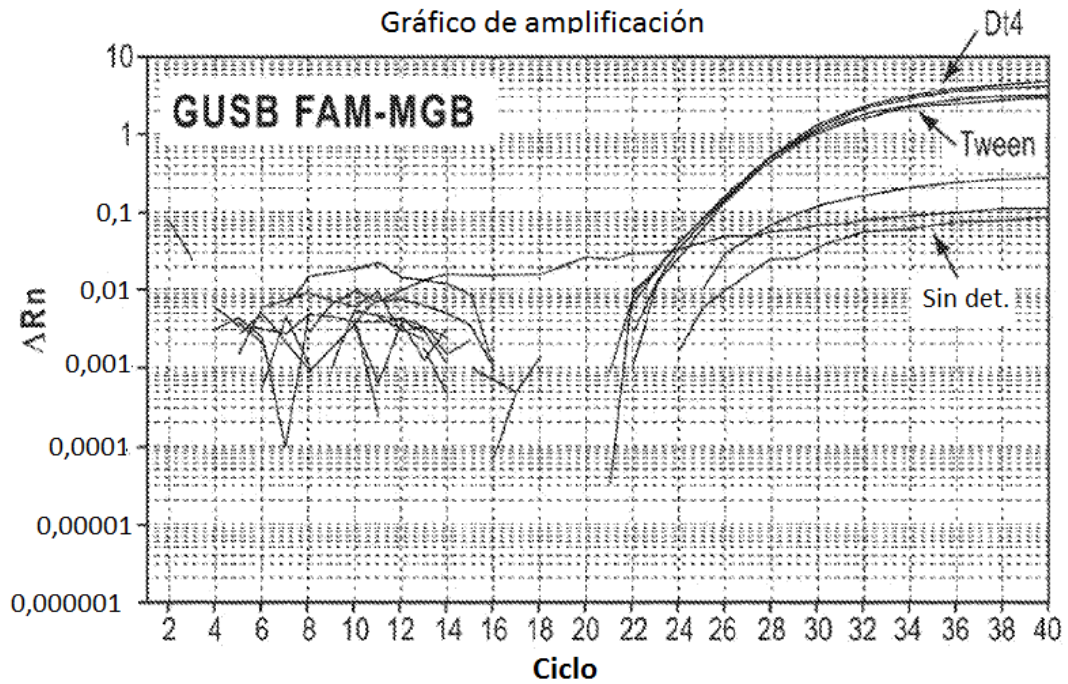


FIG. 8-4

Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween 20

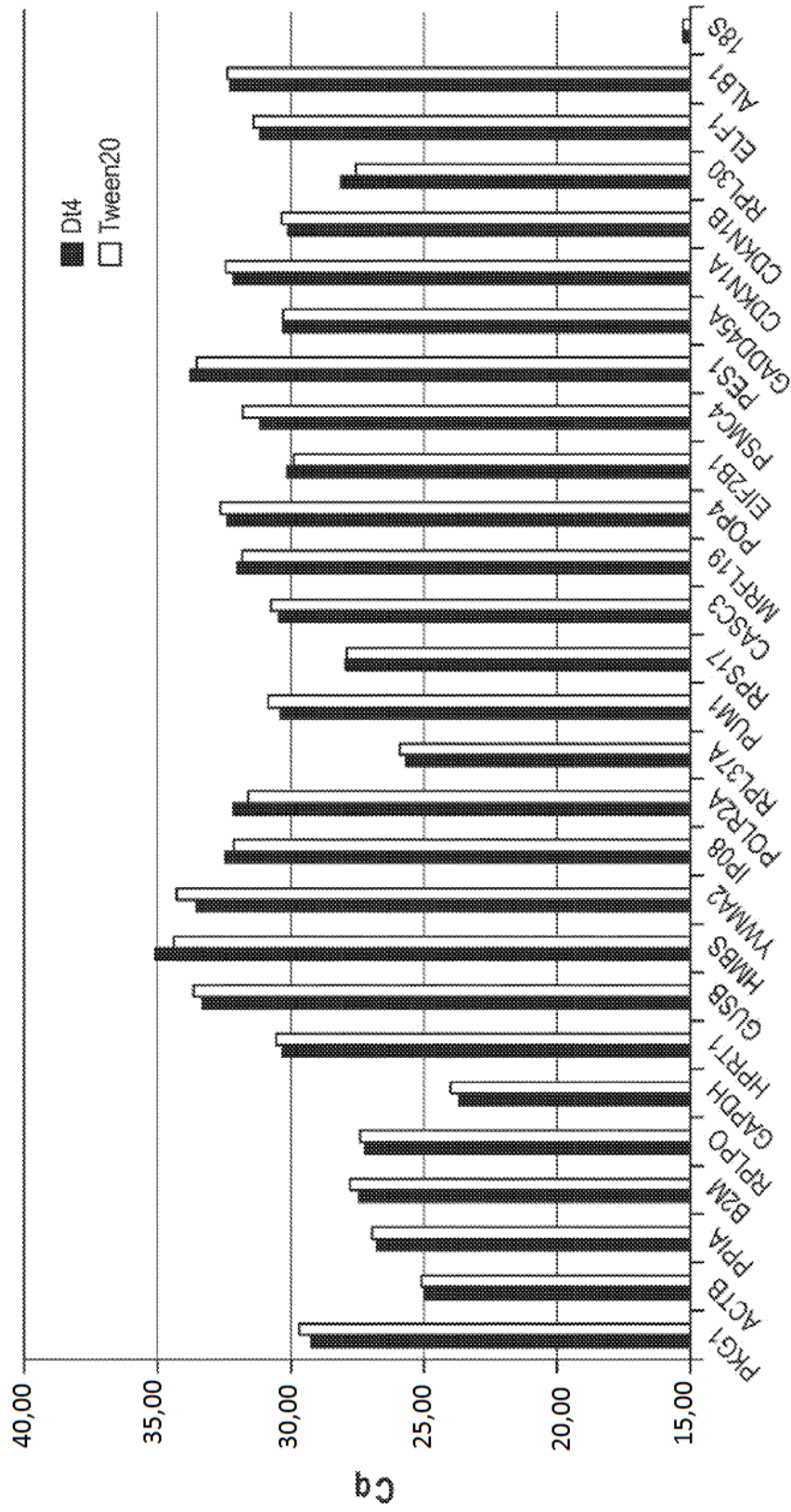
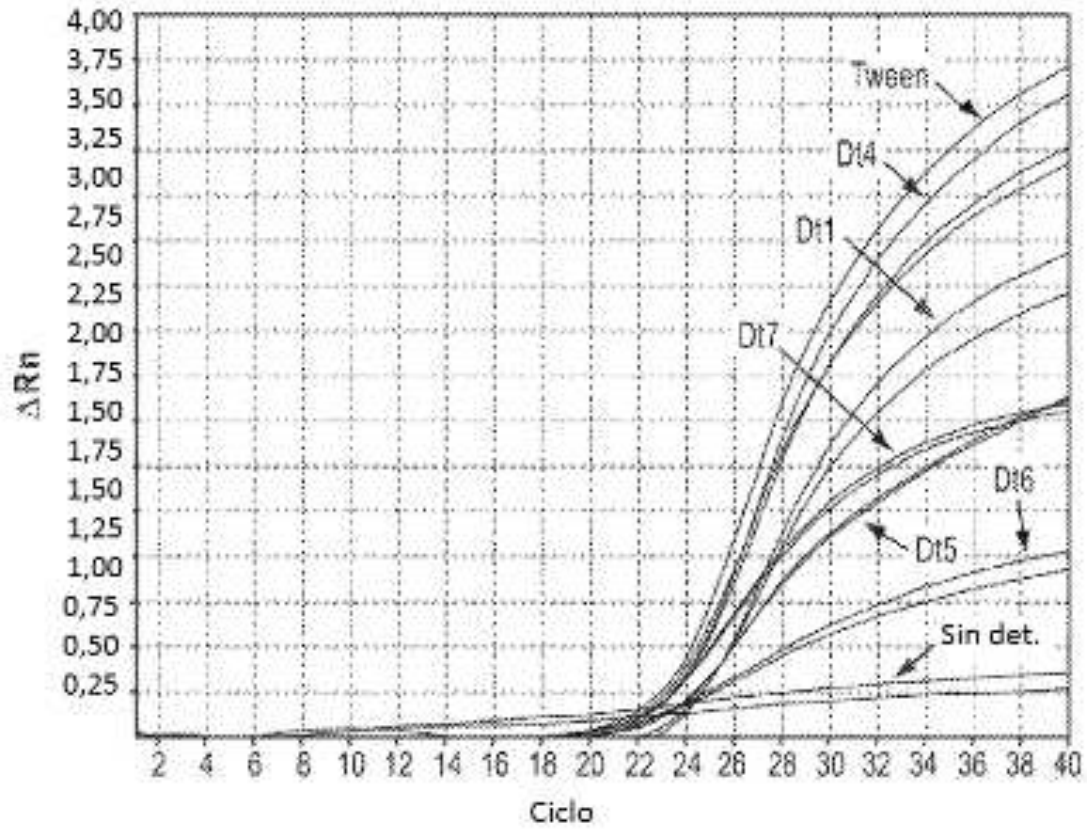


FIG. 9

Derivados de detergente en comparación con Tween 20

Gráfico de amplificación



Derivados de detergente: Dt1, Dt3, Dt5, Dt6, Dt7

FIG. 10

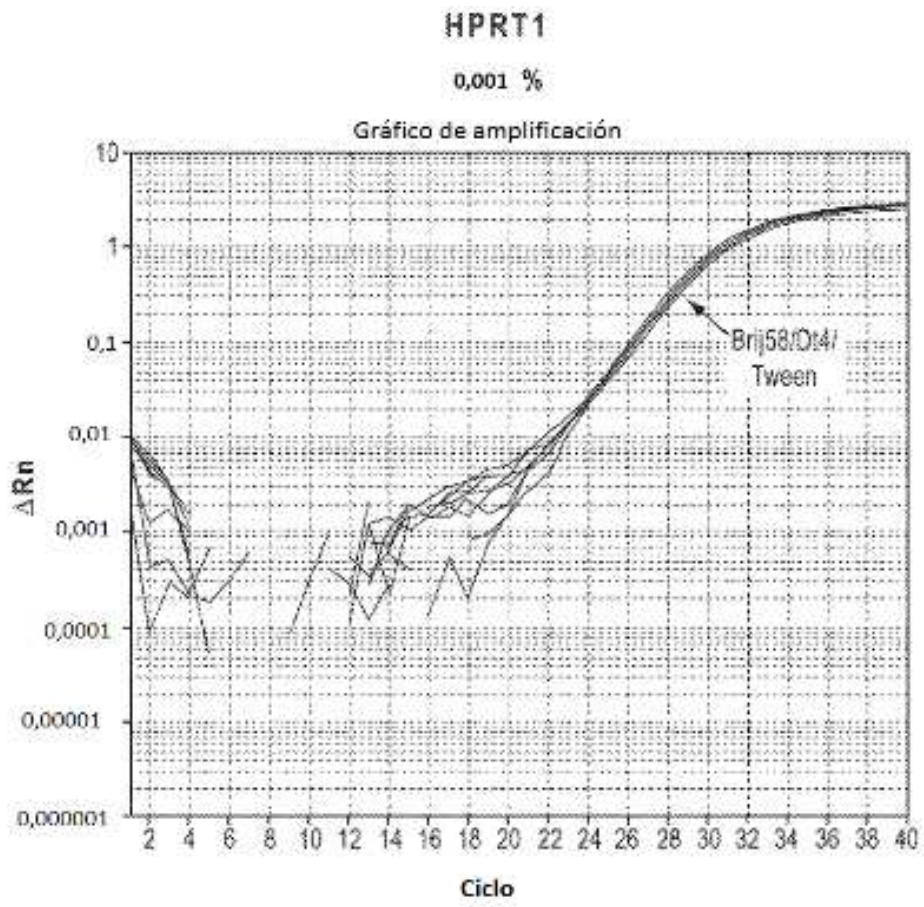


FIG. 11-1

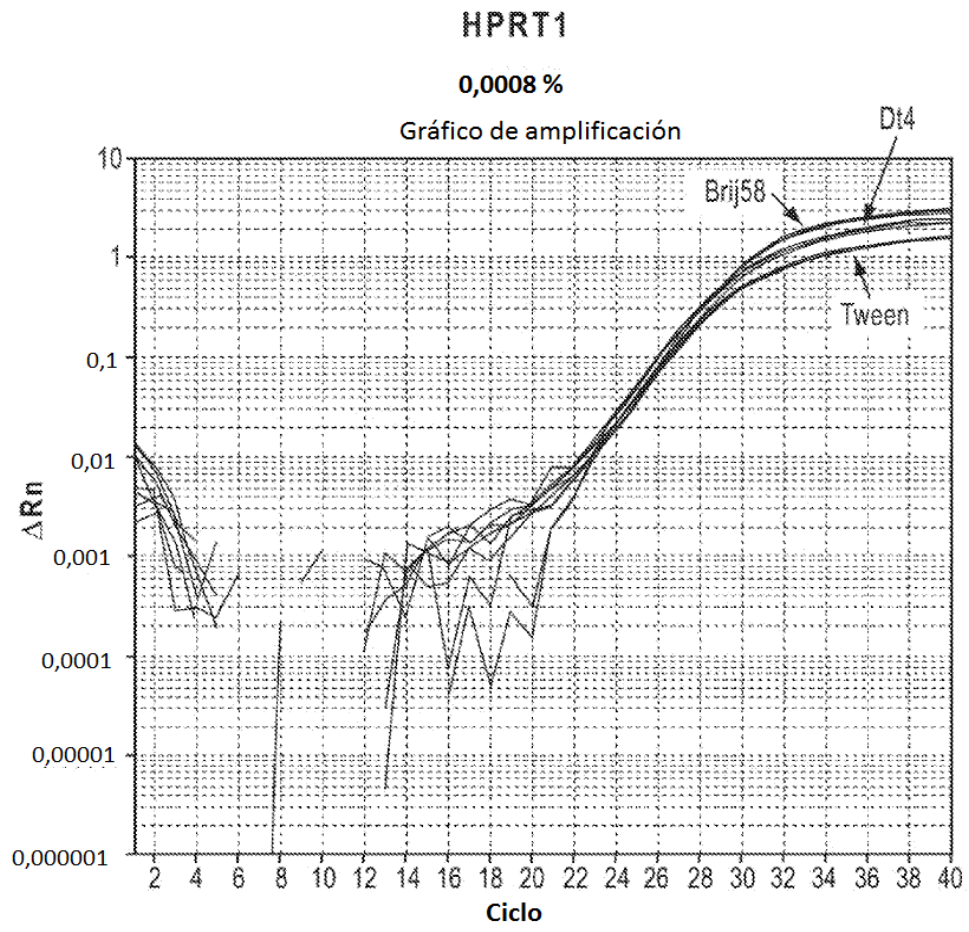


FIG. 11-2

HPRT1

0,0006 %

Gráfico de amplificación

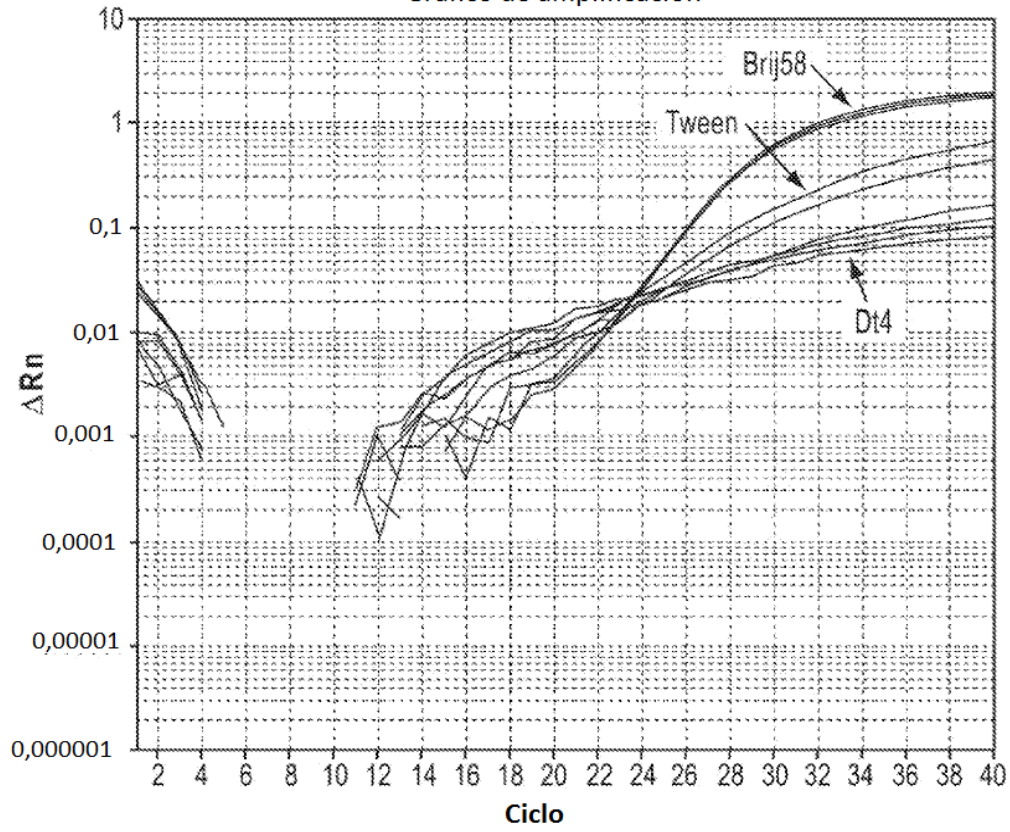


FIG. 12-1

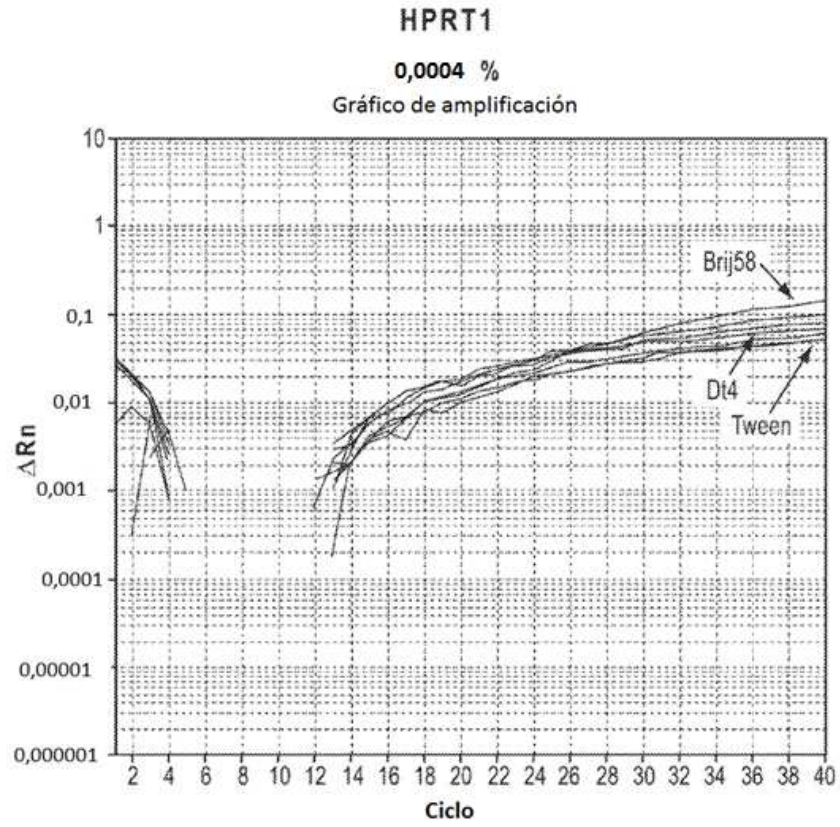


FIG. 12-2

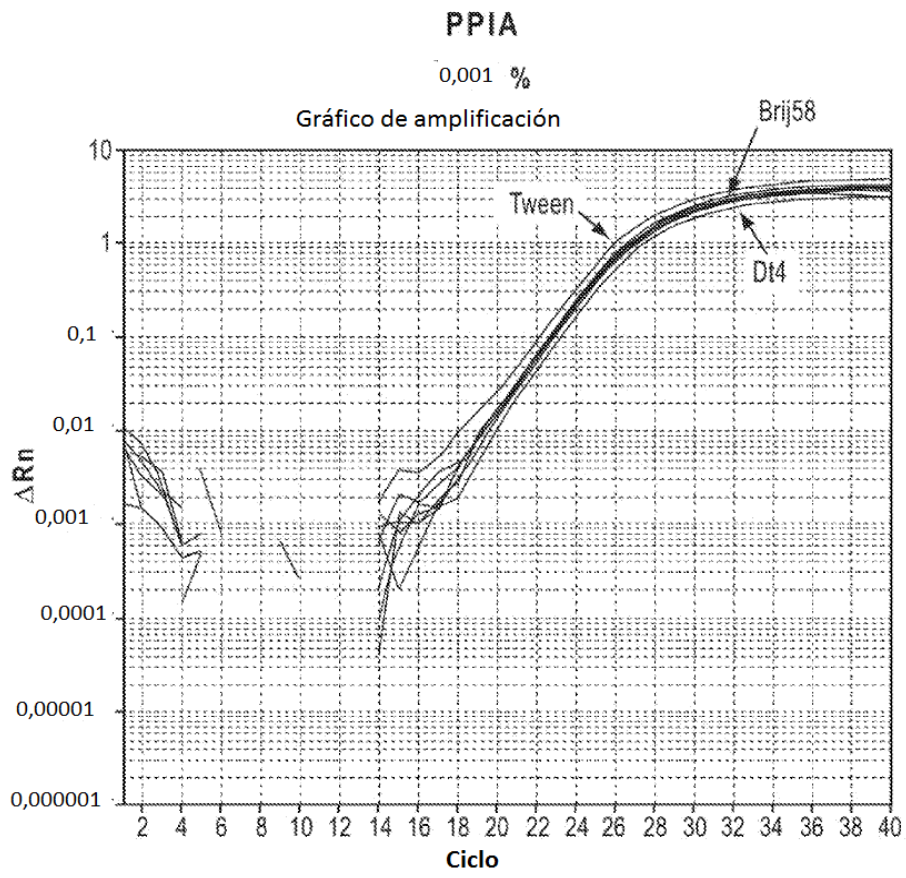


FIG. 13-1

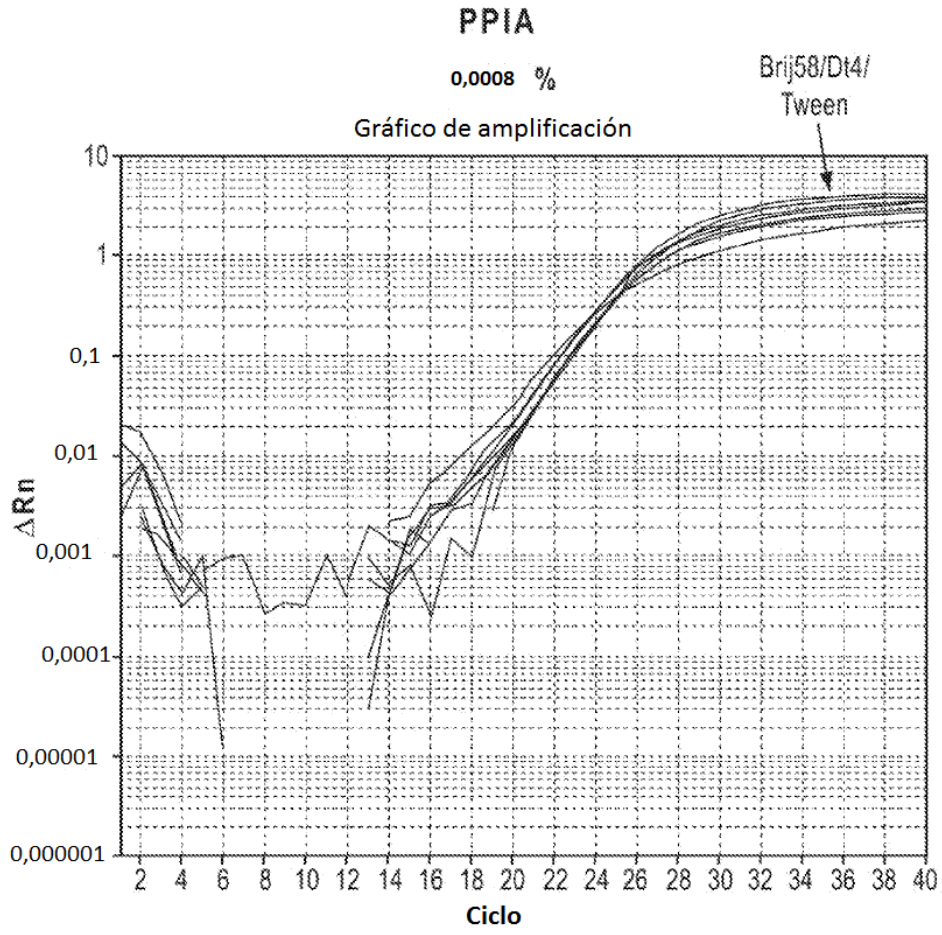


FIG. 13-2

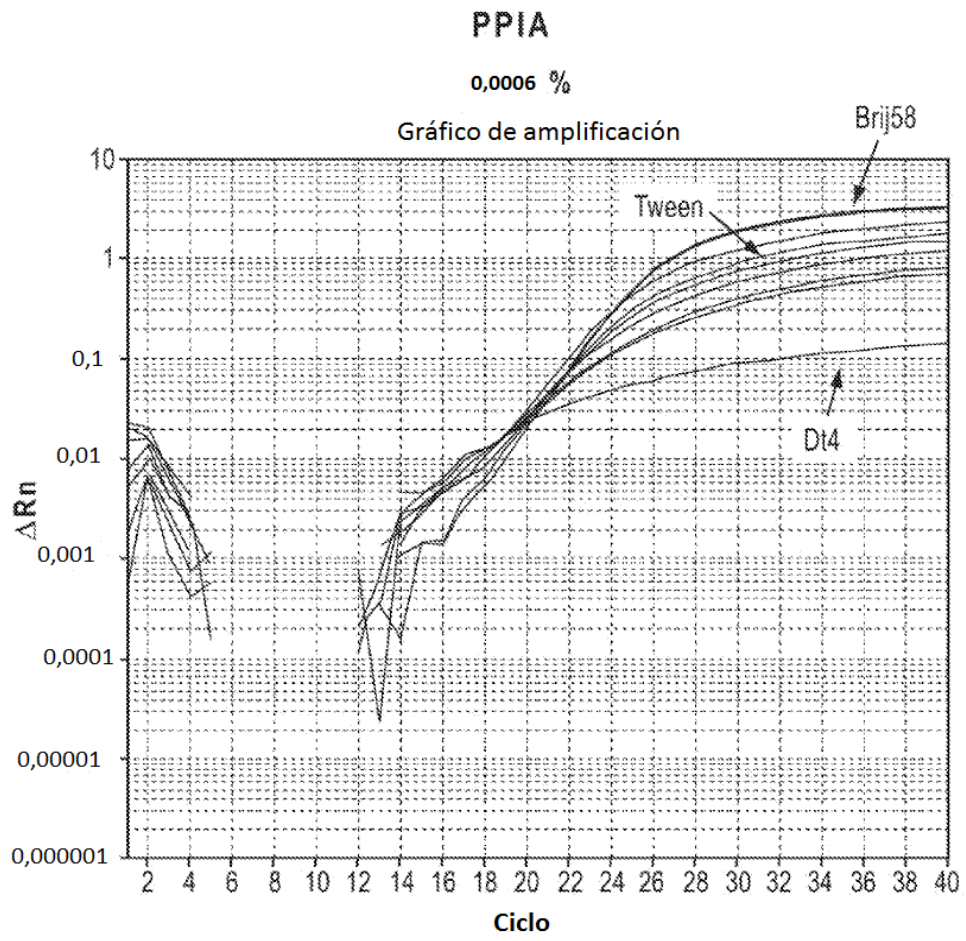


FIG. 14-1

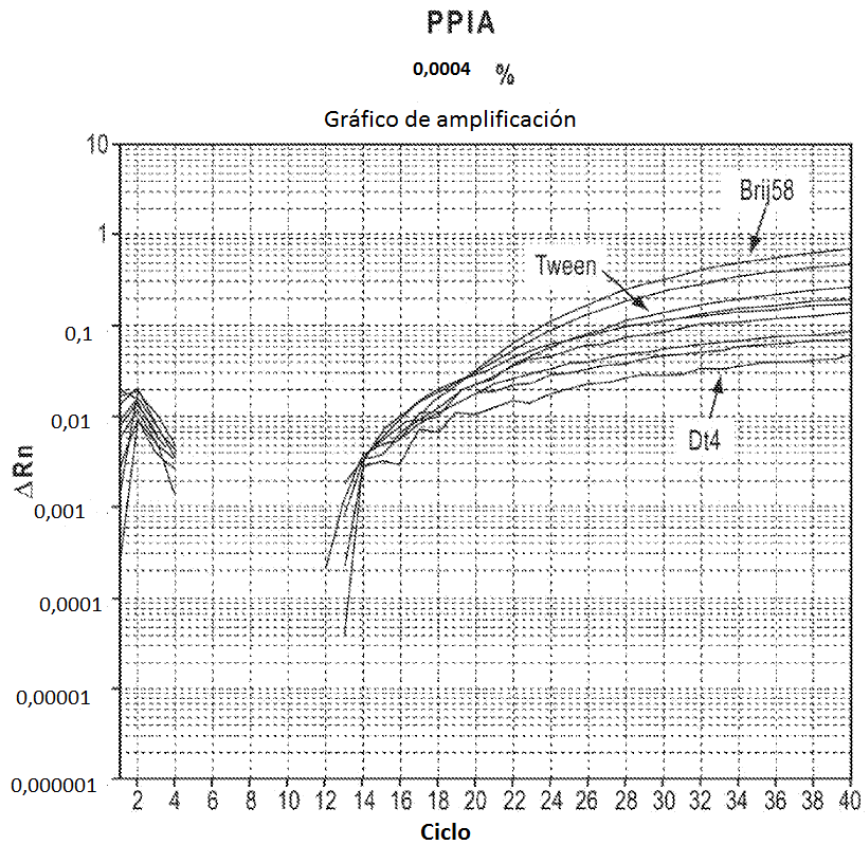


FIG. 14-2

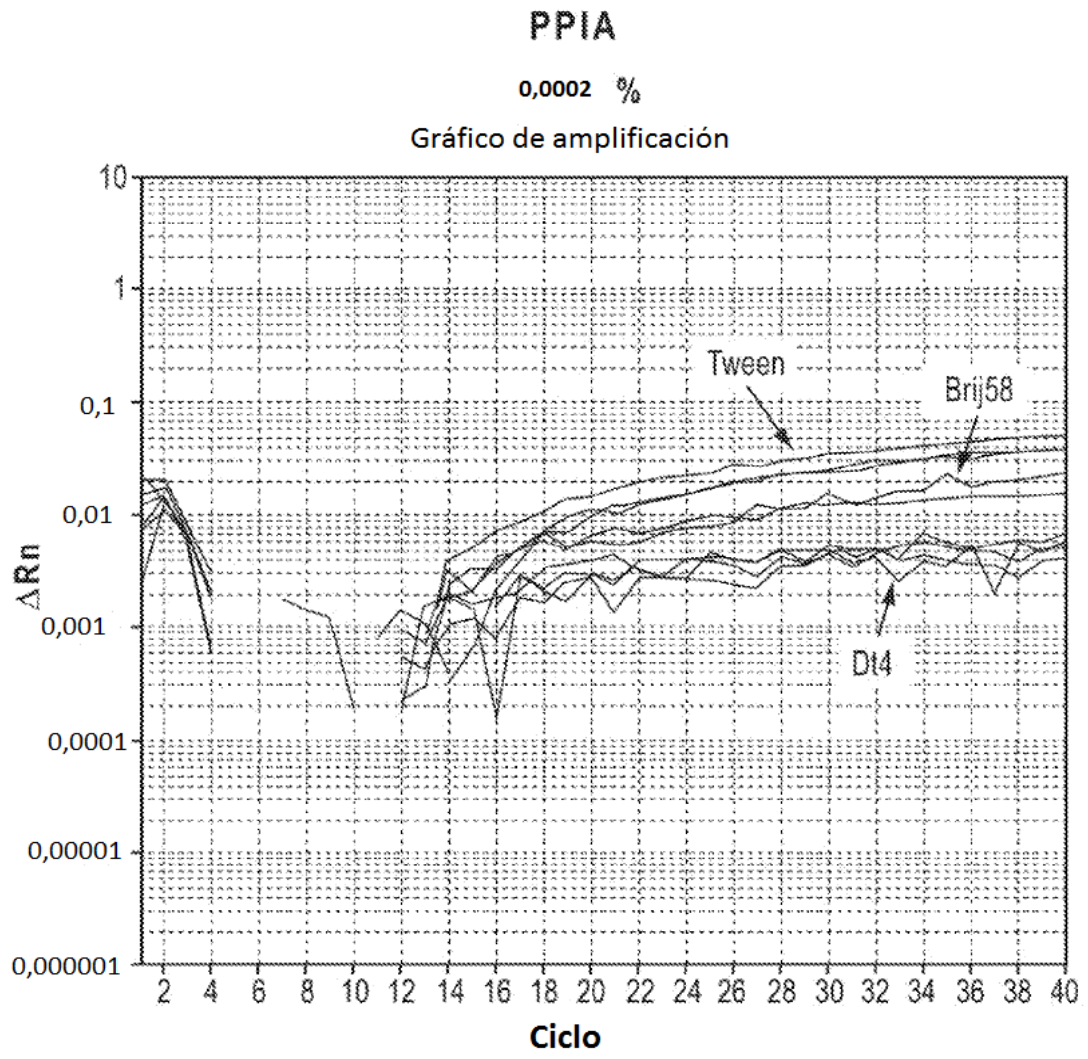


FIG. 15-1

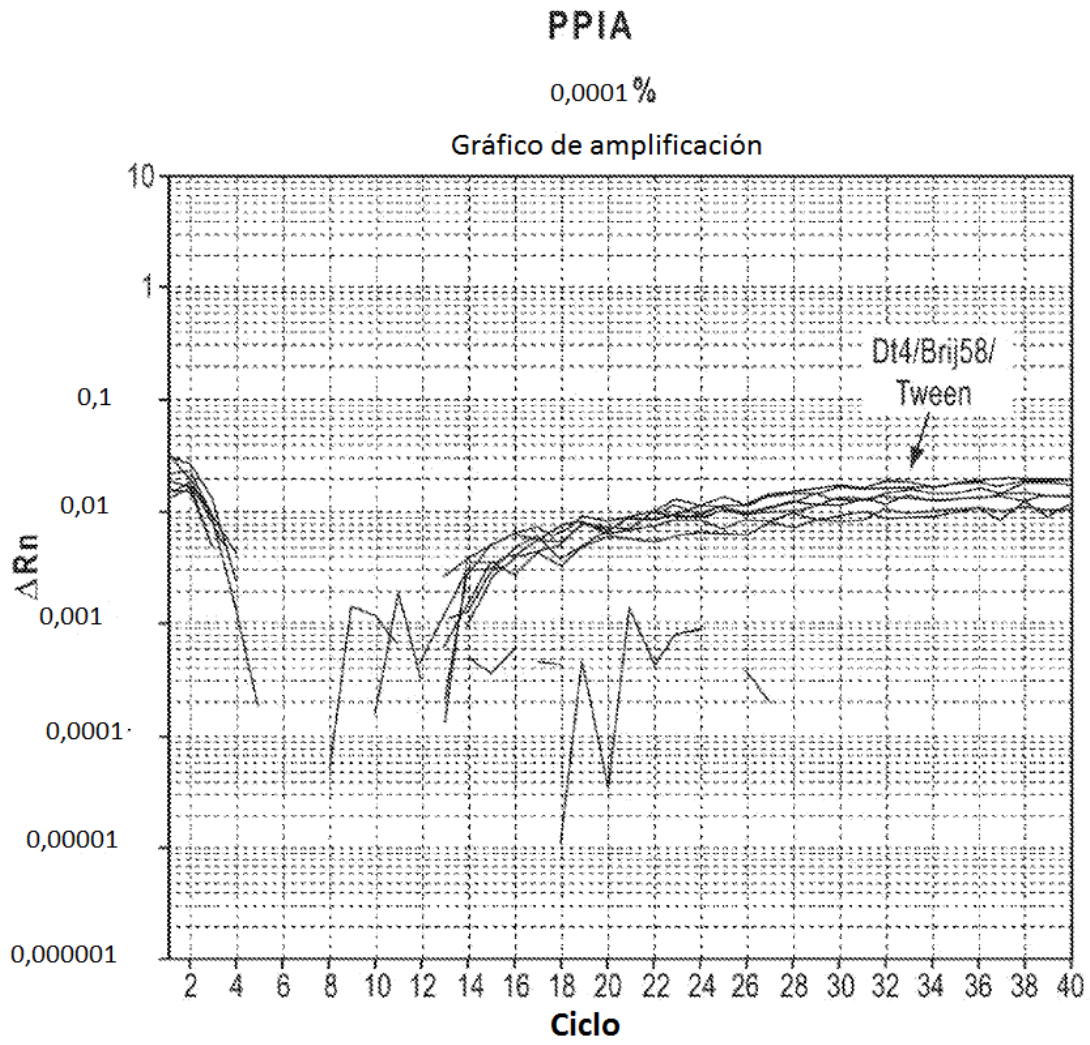


FIG. 15-2

B2M

Gráfico de amplificación

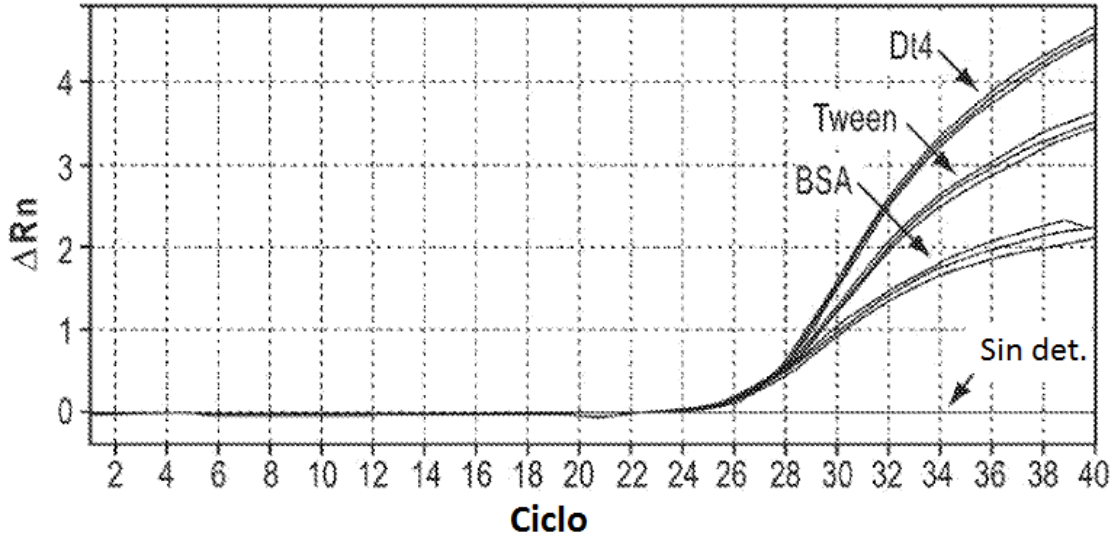


FIG. 16

GAPDH

Gráfico de amplificación

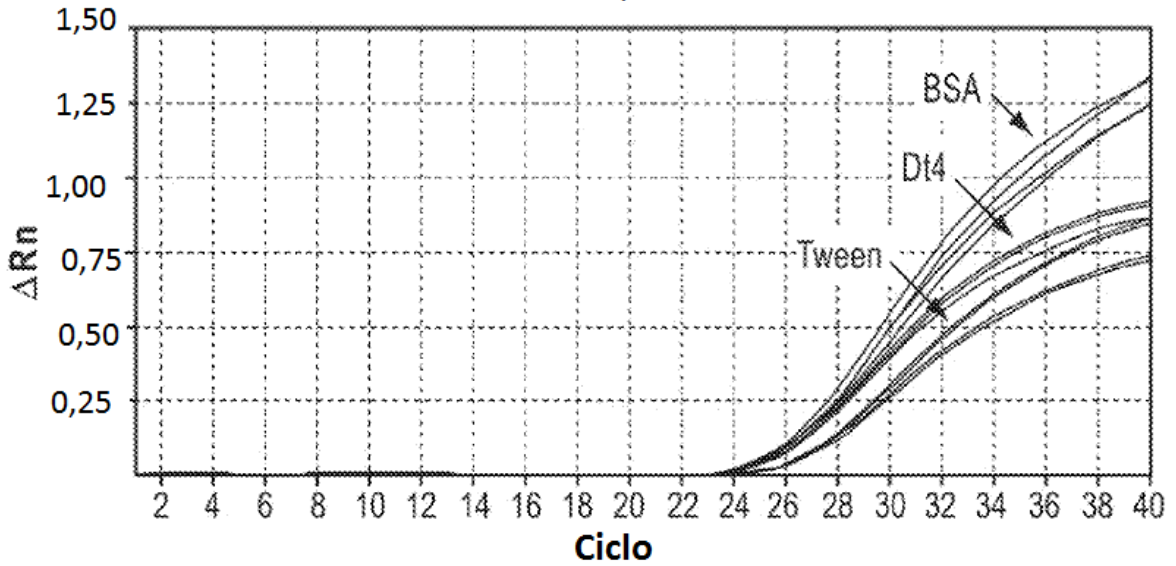


FIG. 17

RPLPO

Gráfico de amplificación

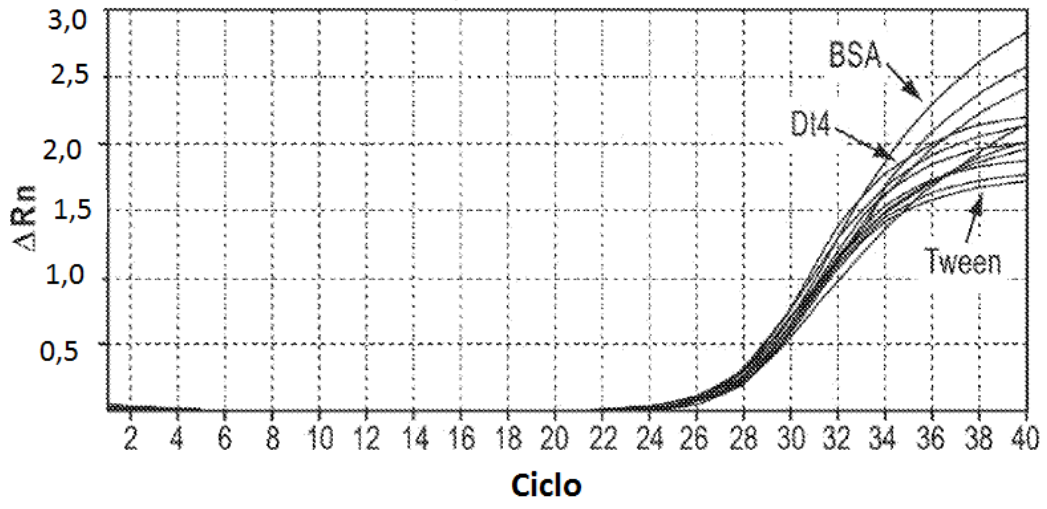
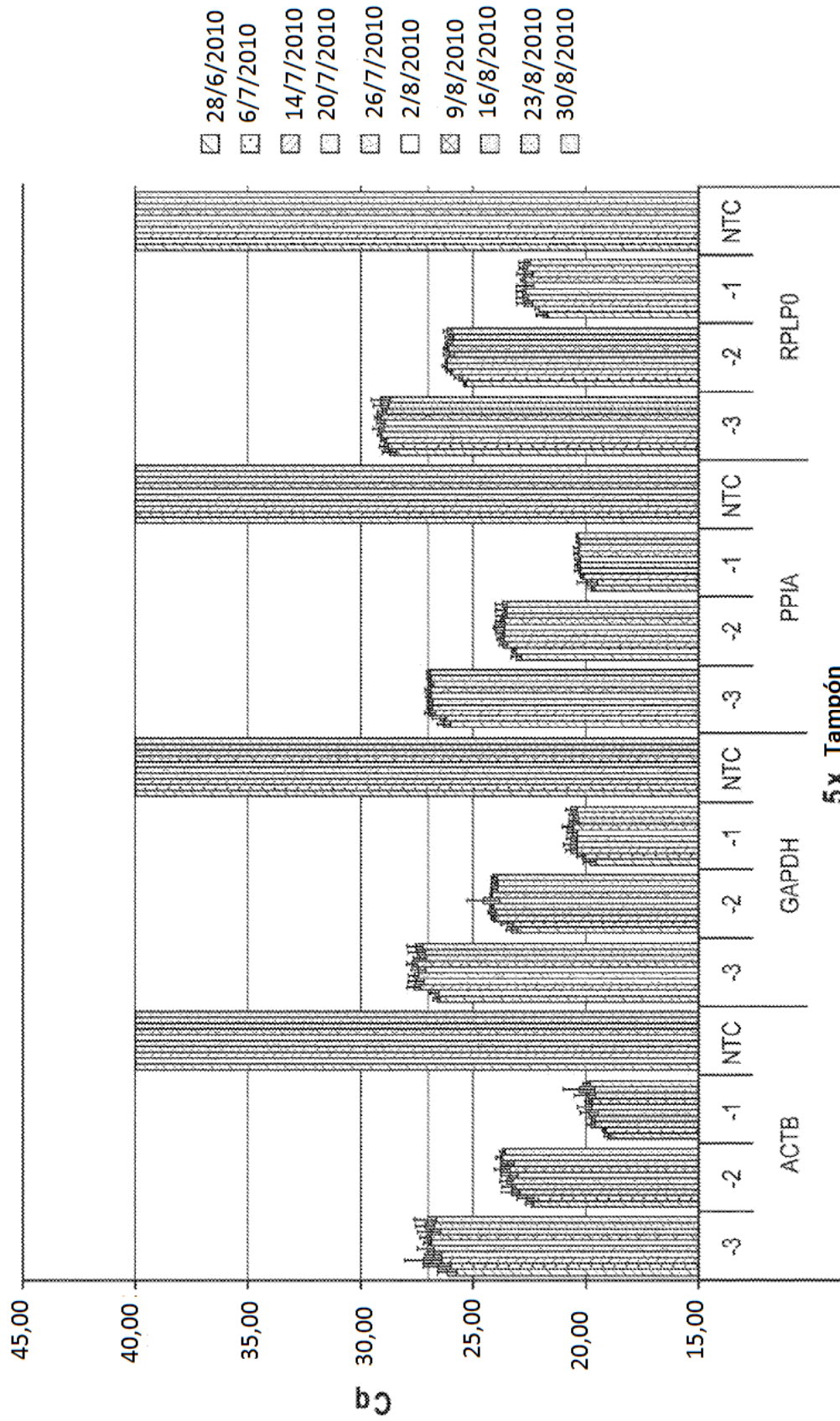
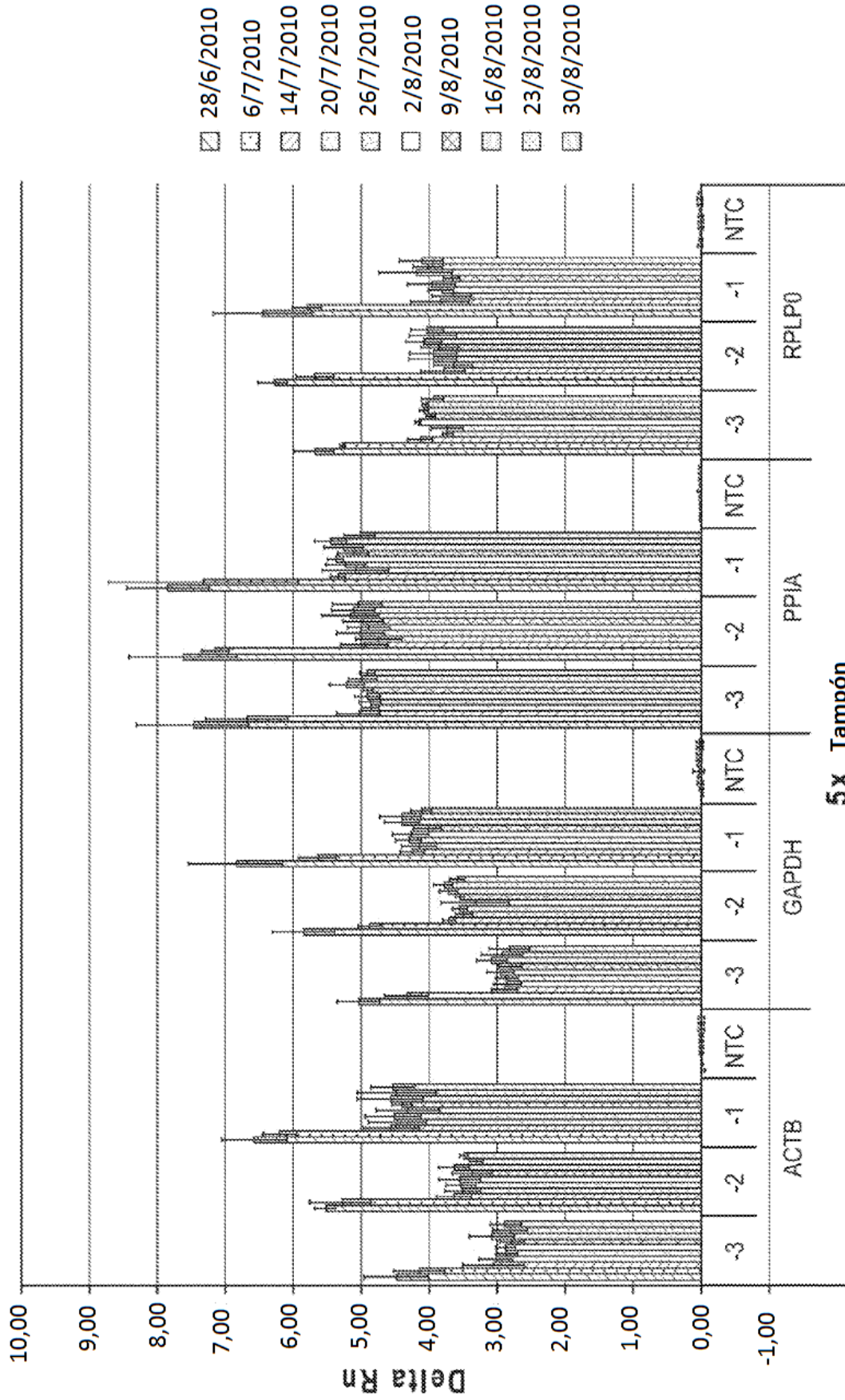


FIG. 18

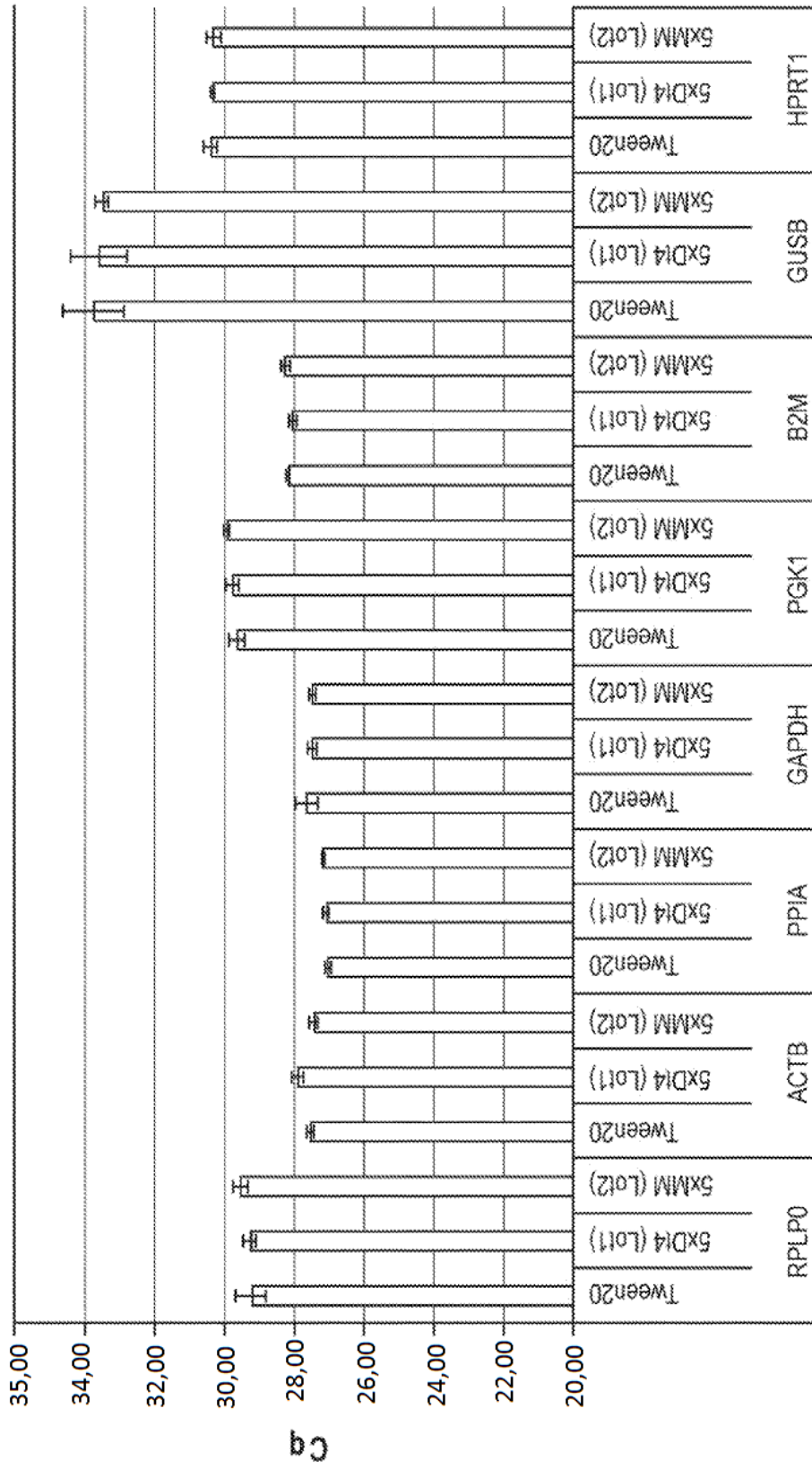


5x Tampón
FIG. 19



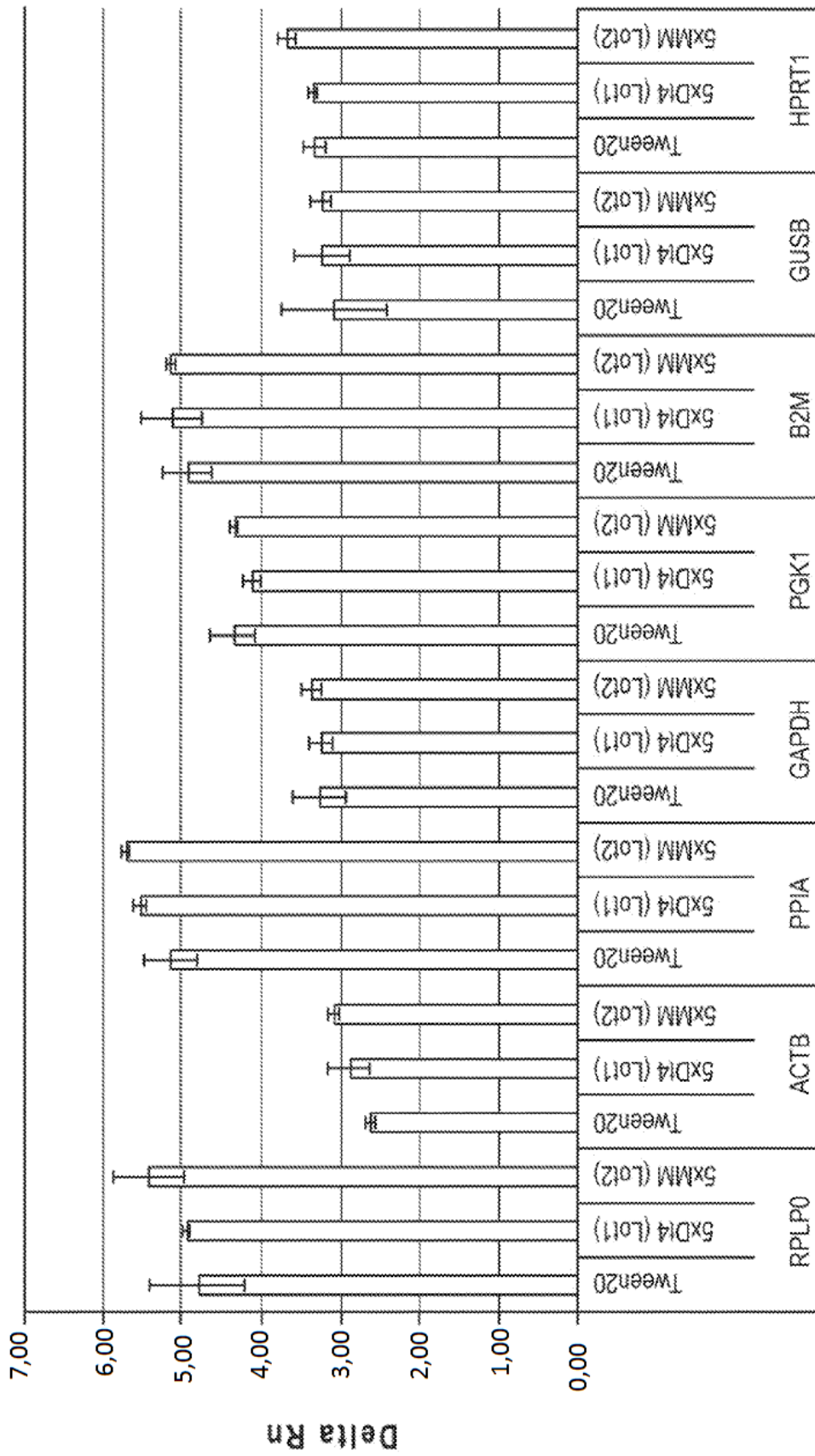
5x Tampón

FIG. 20



Ensayo/Detergente

FIG. 21



Ensayo/Detergente

FIG. 22

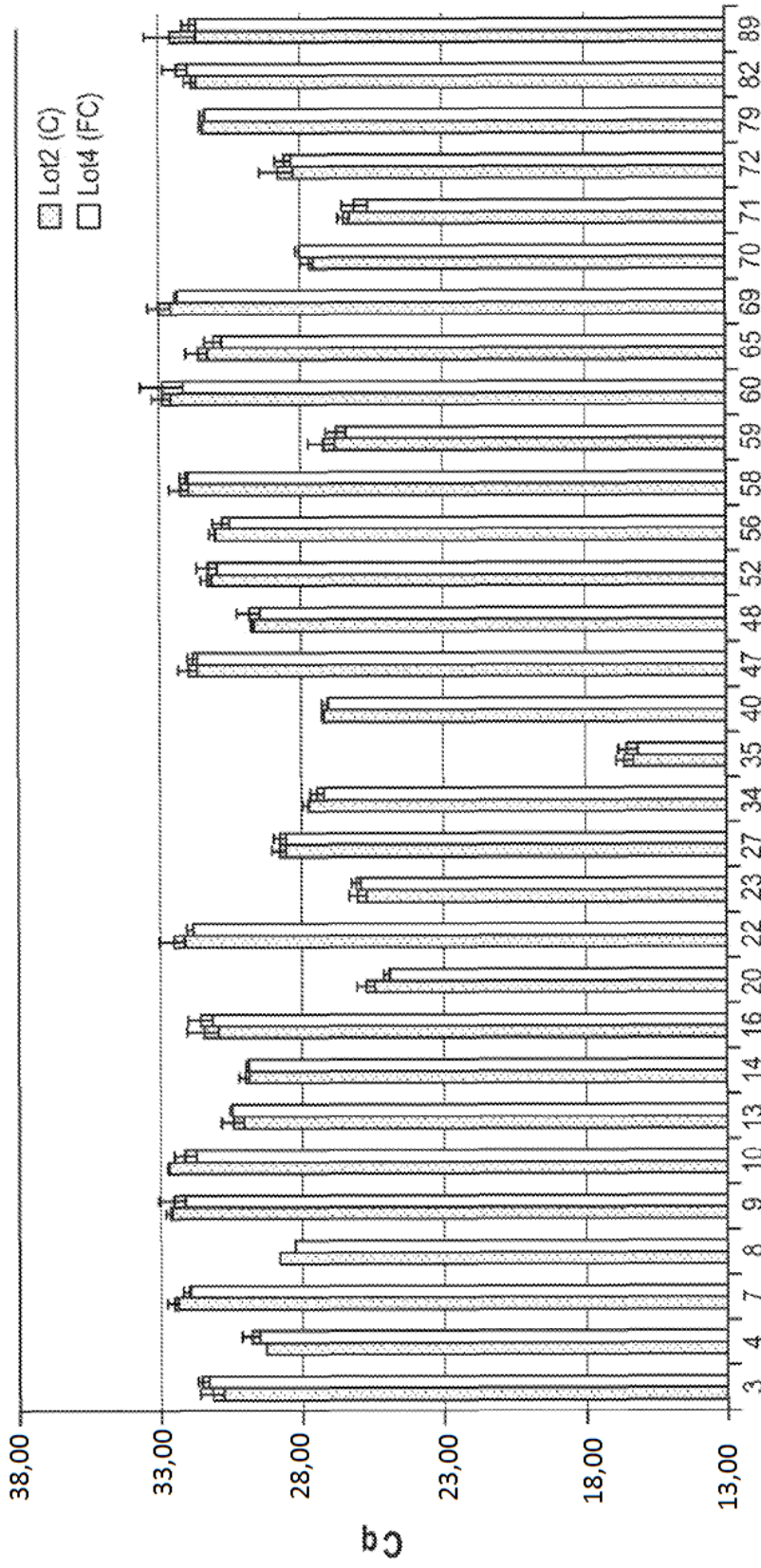


FIG. 23