

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 849**

51 Int. Cl.:

C07C 229/12 (2006.01)

C07C 229/24 (2006.01)

C07D 207/16 (2006.01)

C07D 211/60 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012** **E 18185275 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2023** **EP 3461807**

54 Título: **Diseño y desarrollo de detergentes novedosos 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:

07.12.2023

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:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 955 849 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 detergentes novedosos para su uso en sistemas de pcr

5 Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/494.812, presentada el 8 de junio de 2011, con el título "Design and Development of Novel Detergents for Use in PCR Systems"

10 Campo

Esta descripción se refiere a detergentes modificados para su uso en diversos procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacciones de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se describen también métodos para preparar los detergentes modificados.

15 Antecedentes

Muchas técnicas de ADN recombinante ampliamente conocidas implican la replicación o polimerización y/o amplificación del ADN. Uno de dichos ejemplos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la PCR, los ciclos de reacción se suceden repetidamente entre dos temperaturas, una temperatura baja y una alta (p. ej., 55 °C y 95 °C) en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. El tiempo total de permanencia a alta temperatura en el transcurso de la reacción depende del número total de ciclos, de la duración de la etapa de alta temperatura de cada ciclo, y de 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 muy termoestables, con el tiempo tienden a inactivarse a altas temperaturas. Además, estas polimerasas pueden también inactivarse cuando se introducen en entornos 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.

Una forma de estabilizar una enzima en tales condiciones es añadir un agente estabilizante, tal como un tensioactivo. Los tensioactivos, tales como detergentes, son compuestos tensioactivos que estabilizan la interfase 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, tales como NP-40 o Tween® 20 (Bachmann, y col. Nuc. Acids Res. 18(5): 1309 (1990)). En algunas aplicaciones, sin embargo, las ADN polimerasas estabilizadas con Tween® 20 tienen bajas eficiencias de amplificación o dan lugar a la amplificación de productos no específicos. Además, algunos detergentes se requieren a altas concentraciones. Además, también se sabe que algunos detergentes (p. ej., NP-40) tienen propiedades tóxicas. Existe la necesidad, por lo tanto, de detergentes que mejoren la estabilidad de las ADN polimerasas termoestables en solución y especialmente detergentes que mejoren la estabilidad enzimática sin transmitir ninguna de las desventajas de los detergentes utilizados actualmente.

Los documentos con números de acceso de la base de datos CA 1985:579981, 1994:253078 y 1994:510632; y la patente GB 1087415 A describen diversos detergentes.

Breve descripción de los dibujos

Todos los gráficos de amplificación que se muestran en la presente memoria representan gráficamente la amplificación de ácido nucleico diana como ΔR_n (eje y) en función del número de ciclos (eje x).

Figura 1. Valoración volumétrica de detergentes novedosos Dt1 y Dt2 a distintas concentraciones utilizando productos de PCR de 1 Kb y 3 Kb amplificados según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 2. Amplificación del gen de la rodopsina en presencia de detergentes novedosos Dt1 y Dt2 según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 3. Comparación del detergente novedoso Dt2 al 0,004 % y 0,0002 % con NP-40/Tween® 20 para productos de la PCR de 0,1-1 Kb amplificados según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 4. Comparación de los detergentes novedosos Dt2 al 0,004 % y 0,002 % con NP-40/Tween® 20 para productos de la PCR de 1-2 Kb amplificados según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 5. Actividad de PCR: Comparación del detergente novedoso Dt2 con Brij-58 solo para productos génicos de la rodopsina amplificados según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 6. Titulación de detergentes novedosos Dt2 y Dt4 utilizando la secuencia diana Rhod-1043 amplificada según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 7. Comparación de Dt4 con Tween® 20: amplificación de la beta-2 microglobulina (B2M), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína ribosómica grande (RPLPO) y glucuronidasa beta (GUSB) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 8. Comparación de Dt4 con Tween® 20 (escala logarítmica): amplificación de B2M, GAPDH, RPLPO y GUSB según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 9. Comparación de Dt4 con Tween® 0: eficiencia de amplificación de diversos productos de la PCR como se representa por Cq según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 10. Comparación de Dt1, Dt3, Dt5, Dt6 y Dt7 con Tween® 20; amplificación realizada según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 11. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT1), que compara la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,001 % y 0,0008 % de cada uno) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 12. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de HPRT1 comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0006 % y 0,0004 % de cada uno) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 13. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de la peptidil prolil isomerasa A (PPIA) comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,001 % y 0,0008 % de cada uno) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 14. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de PPIA comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0006 % y 0,0004 % de cada uno) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 15. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de PPIA comparando la actividad de Dt4 con Brij-58 y Tween® 20 (0,0002 % y 0,0001 % de cada uno) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 16. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de B2M comparando la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween® 20 según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 17. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de GAPDH comparando la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween® 20 según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 18. Gráfico de amplificación de las reacciones de amplificación de RPLPO comparando la actividad de 0,002 % de Dt4 con 0,01 % y Tween® 20 según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

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 regulador 5 x (reacciones de amplificación de ACTB (beta actina), GAPDH, PPIA y RPLPO) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

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 regulador 5 x (reacciones de amplificación de ACTB (beta actina), GAPDH, PPIA y RPLPO) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 21. Comparación de dos lotes de Dt4 distintos 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 a intervalos de aproximadamente una semana durante dos meses que demuestran la estabilidad de la polimerasa en un regulador 5 x (reacciones de amplificación de ACTB (beta actina), GAPDH, PPIA y RPLPO) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

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 regulador 5 x (reacciones de amplificación de ACTB (beta actina), GAPDH, PPIA y RPLPO) según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Figura 23. Comparación de la amplificación de Dt4 a lo largo de una variedad de ensayos TaqMan®, según determinadas realizaciones ilustrativas de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Resumen

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria se proporcionan detergentes modificados Dt1 y Dt4 para una variedad de usos que incluyen, aunque no de forma limitativa, reacciones de amplificación de ácido nucleico. Se sintetizan detergentes iónicos y de ion híbrido modificando químicamente los materiales de partida simples que se proporcionan. Todos los intermedios se observaron y analizaron utilizando análisis de LC-MS y se utilizaron posteriormente sin purificaciones. En algunas realizaciones, se proporcionan detergentes novedosos tales como Dt4 (descritos a continuación). Estos detergentes novedosos pueden utilizarse en una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacciones de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

También se proporcionan los métodos para polimerizar y/o amplificar un ácido nucleico que comprenden mezclar un ácido nucleico diana con al menos una polimerasa, un cebador, dNTP y al menos uno de los nuevos detergentes Dt1 y Dt4, y polimerizar y/o amplificar el ácido nucleico diana. En dichos métodos puede utilizarse al menos un cebador. 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 uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. La mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. Los métodos pueden incluir además una o más etapas de detección del marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado. Se proporcionan métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico incluyendo en el mismo un detergente novedoso Dt1 o Dt4. Se proporcionan métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4 y combinarlos para formar una mezcla en condiciones tales que se estabiliza la actividad polimerasa de la enzima. La polimerasa puede ser termoestable. Los métodos descritos en la presente memoria pueden proporcionar reacciones de amplificación con eficiencia de amplificación similar a (p. ej., aproximadamente igual), o una mayor eficacia de amplificación cuando está en presencia de un detergente convencional (p. ej., conocido) tal como, por ejemplo, NP-40 y/o Tween® 20. Los detergentes novedosos descritos en la presente memoria pueden sustituir a NP-40 y/o Tween® 20 en una reacción de amplificación.

La concentración eficaz del al menos uno de los nuevos detergentes Dt1 y Dt4 en una mezcla de reacción puede ser menor que la requerida de detergentes convencionales tales como NP-40 y/o Tween® 20. La concentración eficaz del al menos un detergente o detergentes novedosos en una mezcla de reacción puede ser hasta, aproximadamente, o al menos, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces menor que la requerida de detergentes convencionales tales como NP-40 y/o Tween® 20. Se proporcionan también métodos para producir los nuevos detergentes.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. Se proporcionan composiciones que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. La polimerasa puede ser termoestable. Se proporcionan también kits que comprenden reactivos y similares necesarios para llevar a cabo dichos métodos o preparar dichas mezclas.

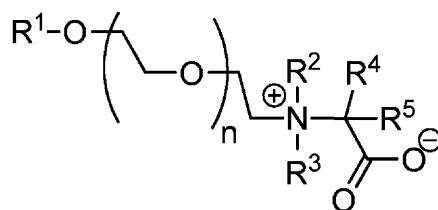
Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan los detergentes novedosos Dt1 y Dt4 (descritos a continuación) para una variedad de usos que incluyen, aunque no de forma limitativa, reacciones de polimerización y/o amplificación de ácido nucleico. En algunas realizaciones, los detergentes iónicos y de ion híbrido se sintetizan químicamente utilizando materiales de partida más simples. Estos detergentes novedosos pueden utilizarse en una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacciones de polimerización y/o amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La presencia de uno o más de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4 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. De este modo, se proporcionan mezclas de reacción que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. Dichas mezclas de reacción pueden comprender además uno o más dNTP y al menos un cebador de amplificación de ácido nucleico (p. ej., cebador de la PCR).

En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. Se proporcionan composiciones que comprenden al menos una polimerasa y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. La polimerasa puede ser termoestable. Se proporcionan también kits que comprenden los componentes de dichas mezclas de reacción y opcionalmente también otros reactivos necesarios para llevar a cabo dichos métodos o para preparar dichas mezclas.

En la presente memoria se describen detergentes novedosos y métodos para preparar y utilizar los mismos. El término “detergente novedoso” se refiere de forma típica a un detergente de Fórmula I. El término “detergente” puede referirse a uno o más detergentes novedosos, que incluyen opcionalmente uno o más “detergentes convencionales”. Como se utiliza en la presente memoria, el término “detergente convencional” se refiere a un detergente distinto de los descritos en la presente memoria bajo la Fórmula I. El término “detergente” puede referirse únicamente a un detergente novedoso, o a una combinación de uno o más detergentes novedosos con uno o más detergentes convencionales. De forma similar, el uso del término “al menos un detergente novedoso” puede referirse a uno o más detergentes novedosos solos, con otro detergente novedoso y/o con uno o más detergentes convencionales. Por lo tanto, las composiciones y/o mezclas de reacción descritas en la presente memoria 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, dodecil sulfato de sodio (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®. Pueden ser también adecuados otros detergentes, como pueda determinar un experto en la técnica (véase, p. ej., la solicitud de patente con número de publicación US-2008/0145910; la solicitud de patente con número de publicación US-2008/0064071; la patente US-6.242.235; la patente US-5.871.975; y la patente US-6.127.155 para detergentes ilustrativos) También pueden ser adecuados detergentes adicionales, como determinaría el experto en la técnica.

La Fórmula I tiene la siguiente estructura:



Fórmula I

en donde:

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 fenilo sustituido está sustituido por 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, de forma alternativa, R⁴ se toma junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros que está opcionalmente sustituido con al menos uno de alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀), heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido;

y,

cada n es independientemente cualquier número entero positivo, que incluye, aunque no de forma limitativa, 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.

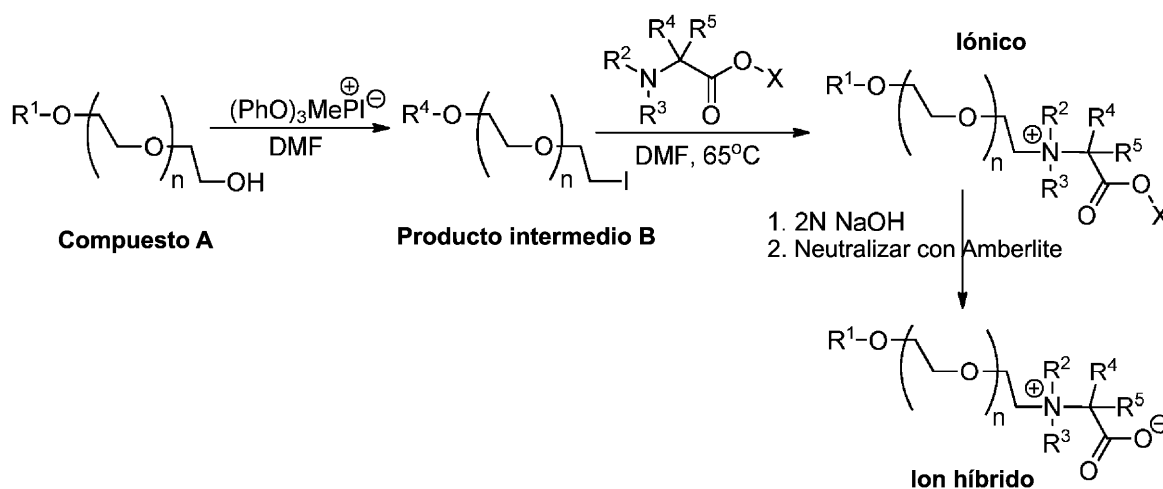
R¹ puede ser un alquilo Cs. R¹ puede ser un alquilo C₁₆. cada uno de R² y R³ puede seleccionarse independientemente de H y CH₃. cada uno de R⁴ y R⁵ puede seleccionarse independientemente de H, (CH₂)ₙNH, (CH₂)ₙN o, de forma alternativa, R⁴ puede tomarse junto con R⁵ para formar un anillo de 5 o 6 miembros.

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

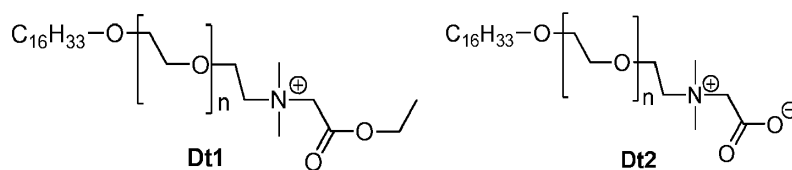
Un método para preparar los detergentes novedosos descritos en la presente memoria incluye combinar secuencialmente el **Compuesto A** (como se muestra en el Proceso 1) (p. ej., 1 eq), yoduro de metiltrifenoxifosfonio (p. ej., 4 eq.), y N, N-dietilformamida (DMF) (p. ej., 6 ml) en un matraz de fondo redondo cubierto con lámina de aluminio (p. ej., 50 ml). A continuación, la reacción se agita durante un período de tiempo suficiente (p. ej., 3 días) en una atmósfera apropiada (p. ej., argón) a una temperatura adecuada (p. ej., temperatura ambiente). Después del período de tiempo suficiente (p. ej., 3 días), puede controlarse el progreso de la reacción (p. ej., utilizando cromatografía líquida analítica/espectrometría de masas (LC-MS). La aparición de un patrón intermedio de producto puede confirmar la formación del detergente modificado. Este producto intermedio esperado (**Intermedio B**) puede

aislarse o no (típico). A este producto intermedio se puede añadir la sal de clorhidrato de éster de aminoácido (p. ej., 2 eq.) y Et₃N (p. ej., 2 eq.). La mezcla de reacción puede calentarse durante un período de tiempo apropiado (p. ej., 3-4 días) a una temperatura adecuada (p. ej., 65 °C). El progreso de la reacción puede controlarse utilizando LC-MS analítica. A continuación, la mezcla de reacción se enfría de forma típica a una temperatura adecuada (p. ej., temperatura ambiente) y se concentra (p. ej., en un rotovapor) a un volumen apropiado (p. ej., aproximadamente 2 ml). A continuación, la mezcla bruta concentrada puede purificarse mediante HPLC preparativa. Las fracciones deseadas pueden agruparse y concentrarse (p. ej., en el rotovapor) para proporcionar el producto deseado (p. ej., como en el Proceso 1 para producir los detergentes iónicos Dt1; y Dt3, Dt5, Dt7, Dt9, Dt11 y Dt12, que no forman parte de la presente invención). Este producto se puede someter a una reacción de hidrólisis (p. ej., utilizando NaOH 2N). La mezcla de reacción puede entonces agitarse (p. ej., a temperatura ambiente) hasta que todo el material de partida se consume según lo determinado por LC-MS analítica. Esto puede ir seguido de neutralización (p. ej., con Amberlite) para producir los productos finales de ion híbrido (p. ej., Dt4; y Dt2, Dt6, Dt10, que no forman parte de la presente invención) o el producto final aniónico (Dt8, que no forma parte de la presente invención).

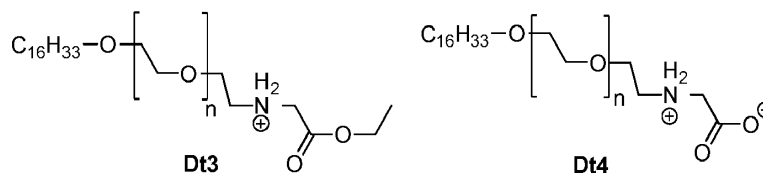
Por lo tanto, se muestra a continuación un método ilustrativo para el desarrollo de los detergentes novedosos de Fórmula I:



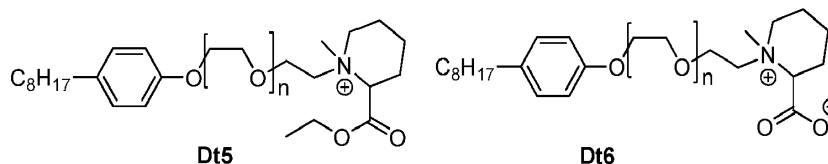
donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y n son como se han descrito anteriormente, y X se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂(C₆H₅) y C(CH₃)₃. Los detergentes novedosos de Fórmula I pueden ser, p. ej., iónicos (p. ej., catiónico, aniónico, de ion híbrido). A continuación se muestran los detergentes novedosos ilustrativos preparados utilizando el Proceso 1



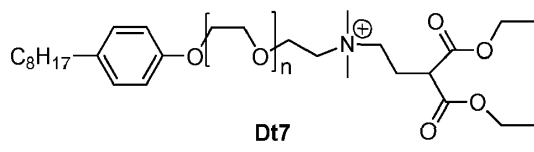
(no forma parte de la presente invención)



(no forma parte de la presente invención)

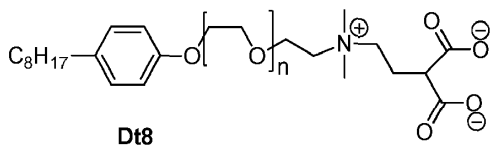


(no forma parte de la presente invención) (no forma parte de la presente invención)



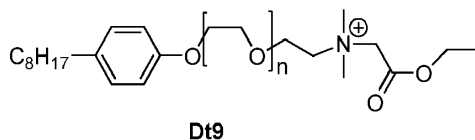
5

(no forma parte de la presente invención)



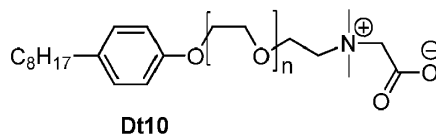
10

(no forma parte de la presente invención)

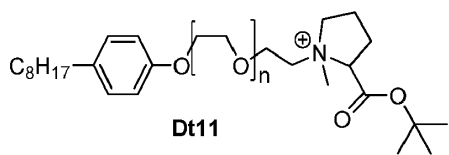


15

(no forma parte de la presente invención)



(no forma parte de la presente invención)

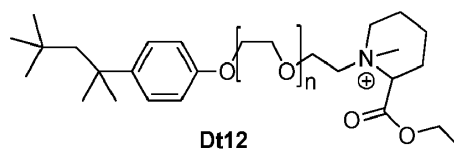


20

y

(no forma parte de la presente invención)

25



(no forma parte de la presente invención)

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

35 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 uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4, y polimerizar y/o amplificar el ácido nucleico diana. Los métodos pueden incluir al menos un cebador. 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 uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4. La mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. Los métodos pueden incluir una o más etapas de detección y/o cuantificación del marcador detectable para detectar y/o cuantificar el ácido nucleico amplificado.

Se proporcionan métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico incluyendo en el mismo un detergente novedoso Dt1 o Dt4. Se proporcionan métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4 y combinarlos para formar una mezcla en condiciones tales que se estabiliza la actividad polimerasa de la enzima. La polimerasa puede ser termoestable. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan reacciones de amplificación con eficiencia de amplificación similar a (p. ej., aproximadamente iguales), o una mayor eficacia de amplificación cuando están en presencia de un detergente convencional (p. ej., conocido) tal como, p. ej., NP-40 y/o Tween® 20. Los detergentes novedosos descritos en la presente memoria pueden sustituir a NP-40 y/o Tween® 20 en una reacción de amplificación.

La “concentración eficaz” (p. ej., la cantidad que soportará una reacción de amplificación tal como la PCR) del al menos un detergente novedoso (Dt1 y/o Dt4) en una mezcla de reacción puede ser mayor, igual o menor que la requerida por los detergentes convencionales ((p. ej., NP-40 y/o Tween® 20). La concentración eficaz de al menos un detergente novedoso (p. ej., Dt4) en una mezcla de reacción puede ser hasta aproximadamente, o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces menor que la requerida de detergentes convencionales tales como NP-40 y/o Tween® 20 p. ej., NP-40 o Tween® 20 se incluyen de forma típica en una reacción a aproximadamente 0,01 % o menos (p. ej., según lo determinado por dilución a partir de una solución madre en una mezcla de reacción). Los detergentes novedosos descritos en la presente memoria pueden utilizarse a una concentración más baja (p. ej., como porcentaje (es decir, p/v o v/v)) que los detergentes convencionales (p. ej., 0,002 % para Dt4 en comparación con 0,01 % para Tween® 20; **Figuras 11-18**).

se proporcionan métodos para polimerizar y/o amplificar un ácido nucleico que comprenden mezclar un ácido nucleico de interés (p. ej., un ácido nucleico diana) con al menos una polimerasa, un cebador, dNTP y al menos uno de los detergentes novedosos Dt1 y Dt4, y polimerizar y/o amplificar el ácido nucleico diana. Los métodos pueden incluir al menos un cebador. Se proporciona una mezcla o mezclas de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprenden al menos una polimerasa, dNTP, al menos un cebador y al menos uno de los detergentes modificados Dt1 y Dt4. Se proporcionan métodos para utilizar dichas mezclas. Los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse utilizando cualquiera de una variedad de reacciones y sistemas.

Como se usa en la presente, los términos “amplificación”, “amplificación de ácido nucleico” o “amplificación” se refieren a la producción de copias múltiples de un molde de ácido nucleico, o a 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 patrón de ácido nucleico (p. ej., mediante polimerización). La reacción de amplificación puede ser una reacción de extensión mediada por polimerasa tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación que se conocen puede ser adecuadas para usar como se describe en la presente. El término “amplificación” que típicamente se refiere a un aumento “exponencial” en el ácido nucleico objetivo se puede usar en este documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia objetivo seleccionada del ácido nucleico.

El término “mezcla de reacción de amplificación” y/o “mezcla maestra” puede referirse a una disolución acuosa que comprende los diversos (algunos o todos) reactivos que se usan para amplificar un ácido nucleico objetivo. Dichas reacciones también pueden llevarse a cabo mediante el uso de soportes sólidos (p. ej., una matriz). Las reacciones también pueden realizarse en formato único o múltiple, según lo desee el usuario. Estas reacciones incluyen típicamente enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de amplificación, el ácido nucleico objetivo y trifosfatos de nucleósidos. En dependencia del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método que se usa para amplificar el ácido nucleico objetivo puede estar disponible para un experto en la técnica. Puede utilizarse cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia de destino de ácido nucleico. Estos incluyen un método de amplificación lineal, logarítmico y/o cualquier otro. Si bien esta descripción puede describir de forma general la PCR como la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, se espera que los detergentes modificados que se describen en la presente memoria sean eficaces en otros tipos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen las reacciones de amplificación mediadas por polimerasas [tales como la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación mediante recombinasa polimerasa (RPA) y la amplificación de círculo rodante (RCA)], así como reacciones de amplificación mediadas por ligasa [tales como la reacción de detección mediada por ligasa (LDR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y las versiones con huecos de cada una] y las combinaciones de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos tales como LDR y PCR (véase, p. ej., la patente US-6.797.470). Por ejemplo, los detergentes modificados pueden usarse en, por ejemplo, varias reacciones mediadas por ligado, donde por ejemplo se emplean sondas de ligado en lugar de cebadores de la PCR. Métodos ilustrativos adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véanse, p. ej., las patentes US-4.683.202, US-4.683.195; US-4.965.188; y/o US-5.035.996), procedimientos isotérmicos utilizando una o más ARN polimerasas (véase, p. ej., publicación PCT n.º WO 2006/081222), desplazamiento de hebra (véase, p. ej., Patente US-RE39007E), destrucción parcial de moléculas de cebador (véase, p. ej., publicación PCT n.º WO 2006/087574), reacción en cadena de la ligasa (LCR) [véase, p. ej., Wu, y otros, *Genomics* 4: 560-569 (1990), y/o Barn, y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:18 9-193 (1991)], sistemas de replicasa de ARN Q β (véase, p. ej., Publicación PCT n.º WO 1994/016108), sistemas basados en transcripción de ARN (p. ej., TAS, 3SR), amplificación por círculo rodante (RCA) [véase, p. ej., la patente US-5.854.033; la solicitud de patente con número de publicación US-2004/265897; Lizardi y col. *Nat. Genet.* 19: 225-232 (1998) y/o Banér y col. *Nucleic Acid Res.*, 26: 5073-5078 (1998)] y amplificación por desplazamiento de cadena

(SDA) [Little, y col. 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 usar en la polimerización y/o amplificación de ácidos nucleicos objetivo para usar como se describe en la presente.

La “eficacia de la amplificación” puede referirse a cualquier producto que pueda cuantificarse para determinar el número de copias (p. ej., el término puede referirse a un amplicón de la PCR, a un producto de ligación de LCR y/o a un producto similar). Si una función de detergente particular según se desee en una reacción de amplificación concreta puede determinarse llevando a cabo al menos dos reacciones de amplificación separadas, cada reacción se lleva a cabo en ausencia y presencia, respectivamente, de un detergente que cuantifica la amplificación que se produce en cada reacción. También pueden ensayarse diversas concentraciones o combinaciones de detergentes en mezclas de reacción separadas para determinar el efecto sobre la eficiencia de la amplificación. La eficacia de la amplificación y/o la polimerización puede determinarse mediante varios métodos conocidos en la técnica, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la determinación de curvas de dilución de calibración y cálculo de la pendiente, la determinación utilizando el software qBase como se describe en Hellemans y col, Genome Biology 8:R19 (2007), la determinación utilizando el cálculo de delta delta Cq ($\Delta\Delta Cq$) como se describe en Livak y Schmittgen, Methods 25:402 (2001) o mediante el método que se describe en Pfaffl, Nucl. Acids Res. 29:e45 (2001).

Los métodos ejemplares para polimerizar y/o amplificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, las reacciones de extensión mediadas por la polimerasa. Por ejemplo, la reacción de extensión mediada por la polimerasa puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otras modalidades, la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción que produce varios productos simultáneamente. Por ejemplo, se comercializan métodos ilustrativos para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para su uso como se describe en la presente memoria como TaqMan® (véanse, p. ej., las patentes US-4.889.818; US-5.079.352; US-5.210.015; US-5.436.134; US-5.487.972; US-5.658.751; US-5.210.015; US-5.487.972; US-5.538.848; US-5.618.711; US-5.677.152; US-5.723.591; US-5.773.258; US-5.789.224; US-5.801.155; US-5.804.375; US-5.876.930; US-5.994.056; US-6.030.787; US-6.084.102; US-6.127.155; US-6.171.785; US-6.214.979; US-6.258.569; US-6.814.934; US-6.821.727; US-7.141.377; y/o US-7.445.900). Los ensayos TaqMan® se llevan a cabo de forma típica mediante una amplificación de ácidos nucleicos sobre un polinucleótido diana utilizando una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa 5' a 3', un cebador capaz de hibridar con dicho polinucleótido diana y una sonda de oligonucleótido capaz de hibridar con dicho polinucleótido diana en 3' con respecto a dicho cebador. La sonda de oligonucleótido incluye de forma típica un marcador detectable (p. ej., una molécula indicadora fluorescente) y una molécula inhibidora capaz de inhibir la fluorescencia de dicha molécula indicadora. En ciertas modalidades, el marcador detectable y la molécula atenuadora 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 atenuadora. El marcador detectable (p. ej., fluorescencia) se sigue durante la reacción, donde la detección del marcador corresponde a la incidencia de la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., cuanto mayor es la señal, mayor es la cantidad de amplificación). Se conocen en la técnica variaciones de los ensayos TaqMan® (p. ej., el ensayo TaqMan® enriquecido con LNA™) y serían adecuadas para su uso en los métodos descritos en la presente memoria.

Otro sistema ilustrativo adecuado para su uso como se describe en la presente memoria utiliza sondas bicatenarias en métodos de hibridación por desplazamiento (véase, p. ej., Morrison y col. Anal. Biochem., 18:231-244 (1989); y/o Li, y col. Nucleic Acids Res., 30(2,e5) (2002)). En tales métodos, la sonda típicamente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferentes longitudes, donde uno incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula atenuadora. Cuando no se une a un ácido nucleico objetivo, el atenuador suprime la señal del marcador detectable. La sonda se vuelve detectable tras la hibridación de desplazamiento con un ácido nucleico objetivo. Se pueden usar múltiples sondas, cada una de las cuales contiene diferentes marcadores detectables, de manera que se pueden consultar múltiples ácidos nucleicos objetivo en una sola reacción.

Métodos ilustrativos adicionales para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos diana adecuados para el uso como se describe en el presente documento implican “balizas moleculares”, que son sondas oligonucleotídicas monocatenarias en forma de horquilla. En presencia de la secuencia diana, la sonda se despliega, se une y emite una señal (por ejemplo, fluorescencia). Una baliza molecular incluye de forma típica al menos cuatro componentes: 1) el “bucle”, una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria de la secuencia diana; 2) dos “tallos” de 5-7 nucleótidos que se encuentran en cualquier 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 inhibidor que impide que el marcador detectable emita una señal única cuando la sonda está en forma de bucle cerrado (p. ej., no unido a un ácido nucleico diana). Por lo tanto, en presencia de un objetivo complementario, la parte de “tallo” del modelo se separa, lo que resulta en que la sonda hibrida con el objetivo. También se conocen otros tipos de modelos moleculares y pueden ser adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente. Los modelos moleculares pueden usarse en una variedad de sistemas de ensayo. Uno de dichos sistemas es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA®), un proceso isotérmico de una sola etapa para polimerizar y/o amplificar el ARN a ADN bicatenario sin ciclos de temperatura. Una reacción NASBA normalmente requiere el virus de mieloblastosis aviar (AMV), la transcriptasa inversa (RT), la polimerasa T7 de ARN, la ARNasa H y dos cebadores oligonucleotídicos. Después de la amplificación, el ácido nucleico objetivo amplificado puede detectarse mediante el uso de un modelo molecular. Otros usos para los modelos moleculares se conocen en la técnica y son adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente.

El sistema Scorpions™ es otro formato de ensayo ilustrativo que puede utilizarse en los métodos que se describen en la presente memoria. Los cebadores Scorpions™ son moléculas bifuncionales en las que un cebador está unido covalentemente a la sonda, junto con un marcador detectable (p. ej., un fluoróforo) y un resto inhibidor no detectable que inhibe la fluorescencia del marcador detectable. En presencia de un ácido nucleico objetivo, el marcador detectable y el atenuador se separan, lo que conduce a un aumento de la señal que emite el marcador detectable. De forma típica, un cebador utilizado en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5' junto con un elemento “de bloqueo de PCR” (p. ej., un monómero de hexaetilenglicol (HEG) [Whitcombe, y col. Nat. Biotech. 17: 804-807 (1999)] al comienzo del bucle de horquilla. La sonda típicamente incluye una secuencia de tallo autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un atenuador en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales (p. ej., la PCR), el cebador se hibrida con la diana y se produce la extensión debido a la acción de la polimerasa. El sistema Scorpions™ puede utilizarse para examinar e identificar mutaciones puntuales utilizando múltiples sondas que pueden marcarse de forma distinta para distinguir entre las sondas. Mediante el uso de 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. Después del segundo ciclo de desnaturalización y alineamiento, la sonda y el objetivo se hibridan. La secuencia de horquilla después se hibrida con una parte del producto de la PCR recién producido. Esto resulta en la separación del marcador detectable del atenuador y produce la emisión de la señal. Otros usos para tales sondas marcadas se conocen en la técnica y son adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente.

Las polimerasas de ácido nucleico que pueden emplearse en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que se describen pueden ser cualquiera que funcione para realizar la reacción que se desea que incluye, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico de procariota, fúngica, viral, de bacteriófago, vegetal y/o de eucariota. Como se utiliza en la presente memoria, el término “ADN polimerasa” se refiere a una enzima que sintetiza una cadena de ADN *de novo* utilizando una cadena de ácido nucleico como patrón. La polimerasa de ADN usa un ADN o ARN existente como molde para la síntesis de ADN y cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos junto con la cadena del molde, el cual lee. La nueva cadena de ADN que se sintetiza es complementaria a la cadena molde. La polimerasa de ADN 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 de un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) al grupo 3'-hidroxilo de una cadena de oligonucleótido en crecimiento. Esto resulta en la elongación de la nueva cadena en una dirección 5' a 3'. Dado que la polimerasa de ADN solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar una reacción de síntesis de ADN, la polimerasa de ADN necesita un cebador al que pueda agregar el primer nucleótido. Cebadores adecuados pueden comprender oligonucleótidos de ARN o ADN, o quimeras de los mismos (p. ej., cebadores quiméricos de ARN/ADN). Las polimerasas de ADN pueden ser una polimerasa de ADN natural o una variante de enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. Por ejemplo, puede incluir una polimerasa de ADN que tiene una actividad de desplazamiento de cadena, una polimerasa de ADN que carece de actividad exonucleasa 5' a 3', una polimerasa de ADN que tiene una actividad de transcriptasa inversa o una polimerasa de ADN que tiene una actividad endonucleasa.

Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas también pueden comprender holoenzimas, partes funcionales de las holoenzimas, polimerasa quimérica o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta descripción, una polimerasa de ADN también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Ejemplos no limitativos de polimerasas pueden incluir, p. ej., ADN polimerasa T7, ADN polimerasa mitocondrial eucariota y ADN polimerasa procariota I, II, III, IV y/o V; la polimerasa eucariota 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*; desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; polimerasas de síntesis translesión; transcriptasa inversa y/o telomerasa. Ejemplos no limitativos de ADN polimerasas termoestables adecuadas que pueden utilizarse incluyen las ADN polimerasas *Taq*, *Tfl*, *Tfi*, *Pfu* y *Vent*™, cualquier ADN polimerasa diseñada mediante ingeniería genética, cualquiera que tenga una actividad exonucleasa 3' a 5' reducida o insignificante (p. ej., la ADN polimerasa SuperScript™) y/o las ADN diseñadas mediante ingeniería genética (p. ej., aquellas que tienen la mutación del sitio activo F667Y o el equivalente de F667Y (p. ej., en *Tth*), AmpliTaq®FS, ThermoSequenase™), AmpliTaq® Gold, Therminator I, Therminator II, Therminator III, Therminator Gamma (todas disponibles de New England Biolabs, Beverly, MA), y/o cualquiera de los derivados y fragmentos de las mismas. Otras polimerasas de ácido nucleico también pueden ser adecuadas como entendería un experto en la técnica.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona mezclas de reacción para polimerizar y/o amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (p. ej., una secuencia diana). La mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. Los métodos también pueden incluir una o más etapas de detección del marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado. Como se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a cualquiera de una variedad de moléculas de señalización indicativas de la amplificación. Por ejemplo, el SYBR® Green y otros colorantes de unión al ADN son marcadores detectables. Tales marcadores detectables pueden comprender o pueden ser, por ejemplo, agentes de intercalación o agentes no de intercalación de ácido nucleico. Como se usa en la presente, un agente intercalante es un agente o resto capaz de insertarse de forma no covalente entre pares de bases apiladas de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Un agente no intercalante 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 mediante el uso, por ejemplo, de fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente mediante el uso, por ejemplo, de cualquier resto o ligando

que se afecte de manera detectable por la proximidad al ácido nucleico bicatenario es adecuado, tal como un resto marcado sustituido o ligando de unión que se une al agente de unión a ácido nucleico. Típicamente es necesario para que el agente de unión a ácido nucleico produzca una señal detectable cuando se une a un ácido nucleico de doble cadena que sea distinguible de la señal que se produce cuando ese mismo agente está en disolución o unido a un ácido nucleico de una cadena. Por ejemplo, agentes intercalantes tales como el bromuro de etidio presentan una fluorescencia más intensa cuando se intercalan en el ADN bicatenario que cuando se unen al ADN monocatenario, al ARN o en disolución (véase, p. ej., las patentes US-5.994.056; US-6.171.785; y/o US-6.814.934). US-6.171.785; y/o US-6.814.934). De manera similar, la actinomicina D emite fluorescencia en la parte roja del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos monocatenarios, y emite fluorescencia en la parte verde del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos bicatenarios. Y en otro ejemplo, se ha informado que el psoraleno fotorreactivo 4-aminometil-4-5',8-trimetilpsoraleno (AMT) muestra una disminución de la absorción a longitudes de onda largas y fluorescencia al intercalarse en el ADN bicatenario (Johnson y col. *Photochem. & Photobiol.*, 33:785-791 (1981)). Por ejemplo, la patente de US-4.257.774 describe la unión directa de intercalantes fluorescentes al ADN (por ejemplo, las sales de etidio, la daunomicina, la mepacrina y la naranja de acridina, 4',6-diamidino- α -fenilindol). Agentes no intercalantes (p. ej., aglutinantes de ranuras menores como se describe en la presente memoria tales como el Hoechst 33258, distamicina, netropsina) pueden ser también adecuados para su uso. Por ejemplo, Hoechst 33258 (Searle, y col. *Nucl. Acids Res.* 18(13):3753-3762 (1990)) presenta una fluorescencia alterada cuando aumenta la cantidad de diana. Los aglomerantes al surco menor se describen con más detalle en otras partes de este documento.

Otros colorantes de unión al ADN están disponibles para el experto en la técnica y pueden usarse solos o en combinación con otros agentes y/o componentes de un sistema de ensayo. Colorantes de unión a ADN ilustrativos pueden incluir, p. ej., acridinas (p. ej., naranja de acridina, acriflavina), actinomicina D [Jain, y col. *J. Mol. Biol.* 68:21 (1972)], antramycin, BOBO™-1, BOBO™-3, BO-PRO™-1, cbromomicina, DAPI [Kapusinski, y col. *Nucl. Acids Res.* 6(112): 3519 (1979)], daunomicina, distamicina (p. ej., distamicina D), colorantes descritos en la patente de US-7.387.887, elipticina, sales de etidio (p. ej., bromuro de etidio), fluorocumanina, intercalantes fluorescentes como se describe en la patente de US-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, mepacina, 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® Verde I (patentes US- 5.436.134 y US-5.658.751), SYBR® Verde II, SYTOX® azul, SYTOX® verde, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, SYTOX® Azul, TO-PRO®-1, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), TOTO™-3, YO-PRO®-1, y YOYO ®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. SYBR® Green I (véase, p. ej., las patentes US-5.436.134; US-5.658.751; y/o US 6.569.927), p. ej., 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 su uso como se describe en la presente memoria, uno o más marcadores detectables y/o agentes inhibidores pueden unirse a uno o más cebadores y/o sondas (p. ej., un marcador detectable). El marcador detectable puede emitir una señal cuando está libre o cuando se une a uno de los ácidos nucleicos objetivo. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está cerca de otro marcador detectable. Los marcadores detectables también pueden usarse con moléculas atenuadoras, de modo que la señal solo sea detectable cuando no esté lo suficientemente cerca de la molécula atenuadora. Por ejemplo, el sistema de ensayo puede hacer que el marcador detectable se libere de la molécula inhibidora de la fluorescencia. Se puede usar cualquiera de varios marcadores detectables para marcar los cebadores y las sondas que se usan en los métodos que se describen en la presente. Como se ha mencionado anteriormente, el marcador detectable puede unirse a una sonda, que puede incorporarse a un cebador, o puede unirse de otro modo al ácido nucleico diana amplificado (p. ej., un agente de unión al ácido nucleico detectable tal como un colorante intercalante o no intercalante). Cuando se usa más de un marcador detectable, cada uno debe diferir en sus propiedades espectrales de modo que los marcadores puedan distinguirse entre sí, o de manera que los marcadores detectables juntos emitan una señal que no se emite por ningún marcador detectable solo. Marcadores detectables ilustrativos incluyen, p. ej., un colorante fluorescente o fluoróforo (p. ej., un grupo químico que puede excitarse por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), los "colorantes aceptores" capaces de inhibir una señal fluorescente de un colorante donante fluorescente, y similares. Marcadores detectables adecuados pueden incluir, p. ej., fluoresceínas (p. ej., 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® p. ej., 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 de TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (p. ej., 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, metilcumarina, cumarina faloidina, hidroxicumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, azul de calceína, colorantes de calcio (p. ej., carmesí cálcico, verde de calcio, naranja de calcio, calcoflúor blanco), Cascade Blue, Cascade Yellow; Colorantes Cy™ (p. ej., 3, 3,18, 3,5, 5, 5,18, 5,5, 7), GFP cyan GFP, cyclic AMP Fluorosensor (FICRhR), proteínas fluorescentes (p. ej., proteína fluorescente verde (p. ej., GFP, EGFP), proteína fluorescente azul (p. ej., BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal), proteína fluorescente cian (p. ej., ECFP, Cerulean, CyPet), proteína fluorescente amarilla (p. ej., YFP, Citrine, Venus, YPet), pares de donantes/aceptores de FRET (p. ej., fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcil, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY® FL/BODIPY® FL, Fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker® y LysoSensor™ (p. ej., LysoTracker® Blue DND-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, dextrano Pm 10.000), Oregon Green (p. ej., 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (p. ej., 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxytetramethylrhodamine (5-TAMRA), 5 GLD, 6-Carboxyrhodamine 6G, Lissamine, Lissamine Rhodamine B, Phalloidine, Phalloidine, Red, Rhod-2, ROX (6-carboxy-X-rhodamine), 5-ROX (carboxy-X-rhodamine), Sulphorhodamine B can C, Sulphorhodamine G Extra, TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine), Tetramethylrhodamine (TRITC), WT), Texas Red, Texas Red-X, VIC y otros marcadores descritos en, p. ej., la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0197254, entre otros, como conocerán los expertos en la técnica. También pueden utilizarse otros marcadores detectables (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0197254), como sabrían los expertos en la técnica. Cualquiera de estos sistemas y marcadores detectables, así como muchos otros, pueden usarse para detectar ácidos nucleicos objetivo amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden basarse en secuencias (también denominados en la presente “marcador detectable específico de locus”), por ejemplo, las sondas de nucleasa 5'. Tales sondas pueden comprender una o más marcadores detectables. Se conocen en la técnica diversos marcadores detectables, p. ej., (las sondas TaqMan® descritas en la presente memoria (véase también la patente US-5.538.848) varias balizas moleculares de tallo-bucle [véase, p. ej., las patentes US-6.103.476 y US-5.925.517 y Tyagi y Kramer, Nature Biotechnology 14:303-308 (1996)], balizas menores o lineales (véase, p. ej., la publicación PCT n.º WO 99/21881; US-6.485.901), balizas PNAMolecular™ (véanse, p. ej., las patentes US-6.355.421 y US-6.593.091), balizas lineales de PNA (véase, p. ej., Kubista y col., SPIE 4264:53-58 (2001), sondas no de FRET (véase, p. ej., Patente US-6.150.097), sondas Sunrise®/Amplifluor® (US-6.548.250), sondas Scorpions™ de tallo-bucle y duplete™ (Solinas y col., Nucleic Acids Research 29:E96 (2001) y US-6.589.743), sondas de bucle con protuberancia (US-6.590.091), sondas de pesudonudo (US-6.589.250), ciclicones (US-6.383.752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas de horquilla (US-6.596.490), sondas light-up de ácido nucleico peptídico (PNA) [Svanvik, y col. Anal Biochem 281:26-35 (2001)], sondas de nanopartículas autoensambladas, sondas modificadas con ferroceno descritas, p. ej., en la patente US-6.485.901; Mhlanga y col., Methods 25:463-471 (2001); Whitcome y col., Nature Biotechnology. 17:804-807 (1999); Isacson y col., Molecular Cell Probes. 14:321-328 (2000); Svanvik y col., Anal Biochem. 281:26-35 (2000); Wolffs y col., Biotechniques 766:769-771 (2001); Tsourkas y col., Nucleic Acids Research. 30:4208-4215 (2002); Riccelli y col., Nucleic Acids Research 30:4088-4093 (2002); Zhang y col., Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai). 34:329-332 (2002); Maxwell y col., J. Am. Chem. Soc. 124:9606-9612 (2002); Broude y col., Trends Biotechnol. 20:249-56 (2002); Huang y col., Chem Res. Toxicol. 15:118-126 (2002); y Yu y col., J. Am. Chem. Soc. 14:11155-11161 (2001); QuantiProbes® (www.qiagen.com), HyBeacons® (French, y col. Mol. Cell. Probes 15:363-374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, y col. Nucl. Acids Res. 30:e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA [Fiandaca, y col. Genome Res. 11:609-611 (2001)], Plexor® (www.Promega.com), cebadores LUX™ [Nazarenko, y col. Nucleic Acids Res. 30:e37 (2002)], cebadores DzyNA [Todd, y col. Clin. Chem. 46:625-630 (2000)]. Los marcadores detectables pueden comprender también restos inhibidores de fluorescencia no detectables que inhiben la fluorescencia del marcador detectable, que incluyen, p. ej., inhibidores black hole (Biosearch), inhibidores Iowa Black® (IDT), inhibidor QSY (Molecular Probes) e inhibidores de sulfonato/carboxilato de Dabsyl y Dabcyl (Epoch). Los marcadores detectables también pueden comprender dos sondas, en donde, por ejemplo, un fluoróforo está en una sonda y un atenuador en la otra, en donde la hibridación de las dos sondas juntas en un objetivo atenúa la señal, o en donde la hibridación en un objetivo altera la firma de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Los sistemas ilustrativos pueden incluir también sistemas ligando FRET, sistemas ligando de salicilato/DTPA [véase, p. ej., Oser y col. Angew. Chem. Int. Engl. 29(10): 1167 (1990)], hibridación por desplazamiento, sondas homólogas y/o ensayos que se describen en la patente europea n.º EP 070685 y/o la patente US-6.238.927. Los marcadores detectables pueden comprender también derivados de sulfonato de colorantes de fluoresceína con SO₃ en vez del grupo carboxilato, formas de fosforamidita de fluoresceína, formas de fosforamidita de Cy5 (comercializadas, p. ej., por Amersham).

Se proporcionan también métodos para inhibir la inactivación de una polimerasa durante un proceso de ciclado térmico al incluir en el mismo un detergente novedoso Dt1 o Dt4. Se proporcionan también métodos para proporcionar una enzima que tiene actividad polimerasa y al menos un detergente novedoso Dt1 o Dt4 y combinarlos para formar una mezcla en condiciones tales que la actividad polimerasa de la enzima se estabiliza. La polimerasa puede ser cualquiera disponible para el experto en la técnica, que incluye, aunque no de forma limitativa, las descritas en la presente memoria. La polimerasa puede ser termoestable.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar una variedad de ácidos nucleicos diana de una muestra de ensayo. Un ácido nucleico objetivo es cualquier ácido nucleico para el cual un sistema de ensayo se diseña para identificar o detectar que está presente (o no) y/o cuantificar en una muestra de ensayo. Dichos ácidos nucleicos pueden incluir, p. ej., los de agentes infecciosos (p. ej., de virus, bacterias, parásitos y similares), de un proceso de enfermedad tal como cáncer, diabetes o similares, o para medir una respuesta inmunitaria. Las “muestras de ensayo” ejemplares incluyen varios tipos de muestras, como las muestras biológicas. Muestras biológicas ilustrativas incluyen, p. ej., un fluido corporal (p. ej., sangre, saliva, fluido espinal), una muestra de tejido, un producto alimenticio (p. ej., carne) o bebida (p. ej., leche), o similares. Los ácidos nucleicos expresados pueden incluir, p. ej., genes para los cuales la expresión (o la falta de la misma) se asocia con dolencias médicas tales como enfermedades infecciosas (p. ej., infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, protozoarias) o cáncer. Los métodos que se describen en la presente memoria pueden utilizarse también para detectar contaminantes (p. ej., bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, alimenticios o bebidas. Los métodos que se describen en la presente memoria pueden utilizarse también para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo salvaje (p. ej., un alelo mutante en presencia de 10⁶-10⁹ alelos de tipo salvaje). Métodos son útiles para, p. ej., detectar una enfermedad residual mínima (p.

ej., las células cancerosas restantes raras durante la remisión, especialmente mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores que previamente se identifican dentro de los tumores), y/o medir la carga mutacional (p. ej., la frecuencia de mutaciones somáticas específicas presentes en tejidos normales, tales como sangre u orina).

También se proporcionan kits para realizar los métodos que se describen en la presente. Como se usa en la presente, el término “kit” se refiere a un conjunto empaquetado de componentes que se relacionan, típicamente 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 novedosos (p. ej., y/o detergentes convencionales, o una mezcla que comprende cualquiera de los mismos), un biocatalizador (p. ej., ADN polimerasa) y/o una o más sondas marcadas que se corresponden con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contienen ácidos nucleicos objetivo que se definen previamente para usarse en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente disoluciones de reserva, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos que se requieren para la detección, tubos, membranas y similares que pueden usarse para completar la reacción de amplificación. Pueden incluirse múltiples conjuntos de cebadores. El kit puede incluir uno o más de, p. ej., un regulador (p. ej., Tris), una o más sales (p. ej., KCl), glicerol, dNTP (dA, dT, dG, dC, dU), BSA recombinante (albúmina de suero bovino), un colorante (p. ej., colorante de referencia pasivo ROX), uno o más detergentes, (p. ej., Dt4), uno o más mecanismos de PCR de arranque en caliente, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y/o gelatina (p. ej., de pescado o bovina).

Para describir y señalar de manera más clara y concisa el objeto de la presente descripción, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se usan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la memoria descriptiva, la ejemplificación de términos específicos debe considerarse como ejemplos no limitantes.

Las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El lenguaje de aproximación, como se utiliza en la presente memoria a lo largo de la especificación y las reivindicaciones, puede aplicarse para modificar cualquier representación cuantitativa que pueda variar de forma permisible sin dar lugar a un cambio en la función básica con la que está relacionada. Por lo tanto, un valor modificado por un término tal como “aproximadamente” no debe limitarse al valor preciso especificado. Cuando es necesario, se han suministrado intervalos, y esos intervalos incluyen todos los subintervalos entre los mismos.

En esta descripción, el uso del singular puede incluir el plural a menos que se indique específicamente lo contrario o a menos que, como entenderá un experto en la técnica a la luz de la presente descripción, el singular sea la única realización funcional. De este modo, por ejemplo, “un” puede significar más de uno, y “una realización” puede significar que la descripción se aplica a múltiples realizaciones. La frase “y/o” indica una forma abreviada de indicar que la combinación específica se contempla en combinación y, por separado, en la alternativa.

Se apreciará que hay un “aproximadamente” implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc. que se describen en los presentes principios, de modo que las desviaciones leves e insustanciales están comprendidas en ámbito de los presentes principios en la presente memoria. También, el uso de “comprenden”, “comprende”, “que comprende”, “contienen”, “contiene”, “que contiene”, “incluyen”, “incluye”, y “que incluye” no pretenden ser limitantes. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención.

A menos que se indique específicamente en la anterior memoria descriptiva, las realizaciones en la anterior memoria descriptiva que enumeran “que comprenden” diversos componentes también se contemplan como “que consisten en” o “que consisten esencialmente en” los componentes enumerados; realizaciones en la memoria descriptiva que enumeran “que consisten en” diversos componentes también se contemplan como “que comprenden” o “que consisten esencialmente en” los componentes enumerados; y las realizaciones en la memoria descriptiva que enumeran “que consisten esencialmente en” diversos componentes también se contemplan como “que consisten en” o “que comprenden” los componentes enumerados (esta intercambiabilidad no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “nucleótido” o “base nucleotídica” se refieren a un nucleósido fosfato. Incluye, aunque no de forma limitativa, un nucleótido natural, un nucleótido sintético, un nucleótido modificado o un resto de sustitución o un nucleótido universal (p. ej., 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, tal como ribosa, y el sitio de esterificación del fosfato puede corresponder al grupo hidroxilo unido a la posición C-5 del azúcar pentosa del nucleósido. Un nucleótido puede ser, aunque no de forma limitativa, undesoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) o un ribonucleósido trifosfato (NTP). Los nucleótidos pueden representarse utilizando letras del alfabeto (designación mediante letras). Por ejemplo, A indica adenosina (es decir, un nucleótido que contiene la base, adenina), C indica citosina, G indica guanosina, T indica timidina, U indica uracilo, e I indica inosina. N representa cualquier nucleótido (p. ej., N puede ser cualquiera de A, C, G, T/U o I). También pueden utilizarse análogos sintéticos y de origen natural, que incluyen, p. ej., hipoxantina, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, N4-metilcitosina, 5,N4-etencitosina, 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 reticulación (p. ej., un agente alquilante).

Como se utiliza en la presente memoria, 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 (p. ej., análogo de fosforotioato). Los oligómeros también pueden incluir bases modificadas y/o cadenas principales (p. ej., enlace fosfato modificado o resto de azúcar modificado). Ejemplos no limitativos de cadenas principales sintéticas que confieren estabilidad y/u otras ventajas a los oligómeros pueden incluir enlaces fosforotioato, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado (Singh, y col. Chem. Commun. 4:455-456 (1998), ácido nucleico de xilosa y/o análogos de los mismos. Los oligonucleótidos pueden ser de cualquier longitud “n”. p. ej., 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 polinucleotídica (N)_n representa un oligonucleótido que consiste en un número n de nucleótidos N (p. ej., (I)₈ es representativa de un oligonucleótido que tiene la secuencia I I I I I I I I; o (A)₁₂ es representativo de un oligonucleótido que tiene la secuencia A A A A A A A A A A A A). Otros tipos de oligonucleótidos o polinucleótidos también pueden ser adecuados para su uso como entendería un experto en la técnica a partir de esta descripción.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “ácido nucleico” se refiere a polímeros de nucleótidos o derivados de los mismos. Como se utiliza en la presente memoria, 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 patrón de ácido nucleico.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “secuencia” se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido o un ácido nucleico. A lo largo de la memoria descriptiva, siempre que un oligonucleótido / ácido nucleico esté 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 donde n=1, 2, 3, 4 y así sucesivamente, representa un oligonucleótido donde el nucleótido o nucleótidos 5' terminales es o son inosina y el nucleótido o nucleótidos 3' terminales es o son adenosina.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “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, dichas 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 (p. ej., no incluye de forma típica el par del cebador) necesario para realizar una reacción de amplificación. La mezcla maestra puede combinarse con uno o más detergentes para formar una mezcla de reacción. Se contemplan también en la presente memoria otras realizaciones de la mezcla de reacción como entendería un experto en la técnica.

Como se utiliza en la presente memoria, 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 utilizan de forma típica para realizar una reacción de amplificación o síntesis de ADN. Incluyen, aunque no de forma limitativa, soluciones utilizadas en métodos de amplificación del ADN, soluciones utilizadas en reacciones de amplificación mediante la PCR, o similares. La solución adecuada para la reacción de síntesis de ADN puede comprender un regulador, sales y/o nucleótidos. Puede comprender además los cebadores y/o patrones de ADN que van a amplificarse. Una o más soluciones de reactivo se incluyen de forma típica en las mezclas de reacciones o mezclas maestras descritas en la presente memoria.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “cebador” o “secuencia de cebador” se refiere a un oligonucleótido lineal corto que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., un patrón de ADN a amplificar) para cebar una reacción de síntesis del ácido nucleico. El cebador puede ser un oligonucleótido de ARN, un oligonucleótido de ADN o una secuencia quimérica (p. ej., que comprende ARN y ADN). El cebador puede contener nucleótidos naturales, sintéticos o modificados. Tanto los límites superior como inferior de la longitud del cebador se determinan empíricamente. El límite inferior sobre la longitud del cebador es la longitud mínima que se requiere para formar un dúplex estable tras 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 longitud) no forman dúplex termodinámicamente estables con el ácido nucleico diana en dichas condiciones de hibridación. El límite superior a menudo se determina por la posibilidad de tener una formación de dúplex en una región distinta de la secuencia de ácido nucleico predeterminada en el ácido nucleico diana. De forma general, las longitudes de cebador adecuadas están en el intervalo de aproximadamente cualquiera de, p. ej., 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 utiliza en la presente memoria, “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 utiliza en la presente memoria, incluye además una o más sustituciones en uno o más átomos de carbono del fragmento de cadena de hidrocarburo.

Como se utiliza en la presente memoria, “arilo” se refiere a un resto aromático que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados, cada uno de los cuales está sustituido de forma opcional e independiente por H, halógeno, ciano, azido,

ácido sulfónico, sal alcalina o de amonio de ácido sulfónico, ácido carboxílico, sal biológicamente compatible de ácido carboxílico, nitro, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alquiltio, amino, monoalquilamino, dialquilamino o alquilamido.

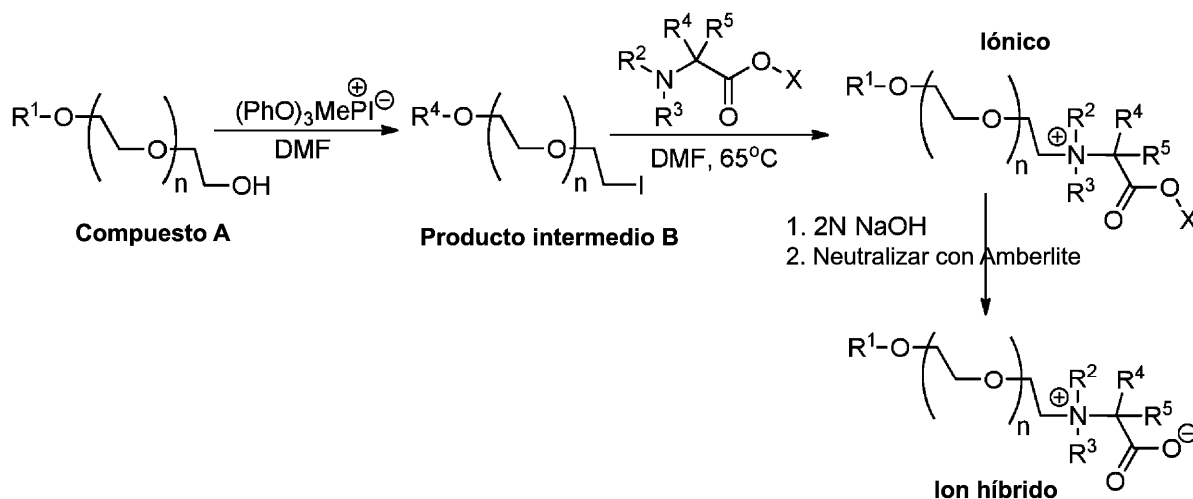
Como se utiliza en la presente memoria, "sustituido" se refiere a una molécula en la que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos por uno o más átomos distintos de hidrógeno, grupos o restos funcionales. p. ej., un nitrógeno no sustituido es $-NH_2$, mientras que un nitrógeno sustituido es $-NHCH_3$. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, halo, p. ej., flúor y cloro, alquilo, alqueno, alquino, sulfato, sulfona, sulfonato, amino, amonio, amido, nitrilo, alcoxi, fenoxi, aromático, fenilo, aromático policíclico y heterociclo.

Se describen adicionalmente determinadas realizaciones en los siguientes ejemplos. Estas realizaciones se proporcionan únicamente como ejemplos y no pretenden limitar el ámbito de las reivindicaciones en modo alguno. Los ejemplos que no caen dentro del ámbito de las reivindicaciones son únicamente con fines ilustrativos.

Ejemplos

Desarrollo de nuevos detergentes

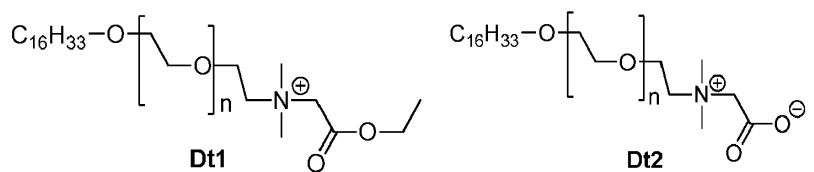
Los nuevos detergentes Dt1, Dt2 (que no forman parte de la presente invención), Dt4, Dt5 (que no forman parte de la presente invención), Dt6 (que no forma parte de la presente invención), Dt7 (que no forma parte de la presente invención), Dt8 (que no forma parte de la presente invención), Dt9 (que no forma parte de la presente invención), Dt10 (que no forma parte de la presente invención), Dt11 (que no forma parte de la presente invención) y Dt12 (que no forma parte de la presente invención) se desarrollaron utilizando el Proceso 1 descrito a continuación:



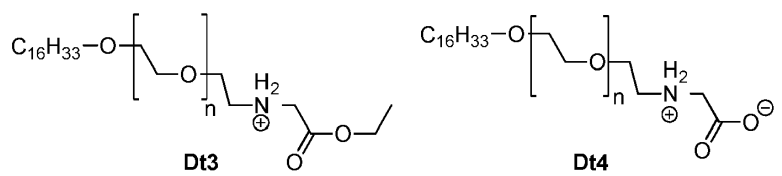
Proceso 1

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , y n son como se han descrito anteriormente, y X se selecciona del grupo que consiste en H , CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2(C_6H_5)$, y $C(CH_3)_3$. Los detergentes novedosos de la Fórmula I pueden ser, p. ej., iónicos (p. ej., catiónico, aniónico, de ion híbrido).

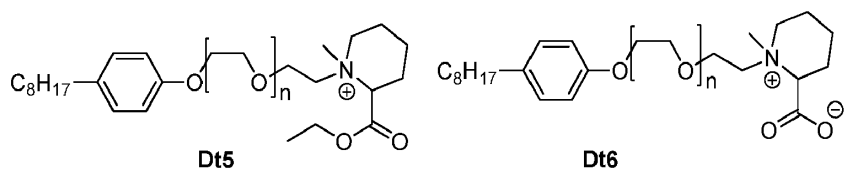
Como se muestra en el Proceso 1, al **Compuesto A** (1 eq.), se añadieron yoduro de metiltrifenoxifosfonio (4 eq.) y N, N-dimetilformamida (6 ml) secuencialmente a un matraz de fondo redondo de 50 ml cubierto de una lámina de aluminio. A continuación, se dejó agitar la reacción durante 3 días en atmósfera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



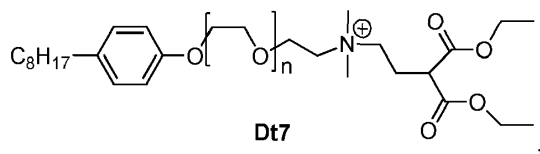
(no forma parte de la presente invención)



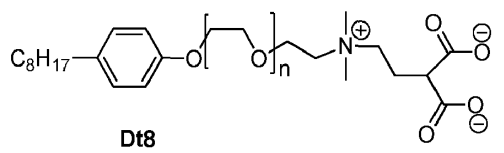
(no forma parte de la presente invención)



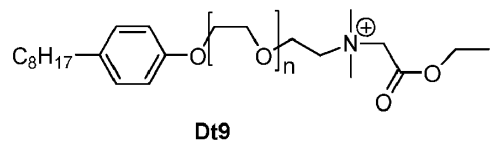
(no forma parte de la presente invención) (no forma parte de la presente invención)



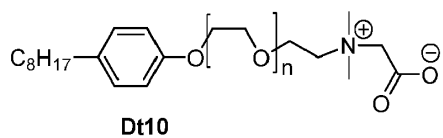
(no forma parte de la presente invención)



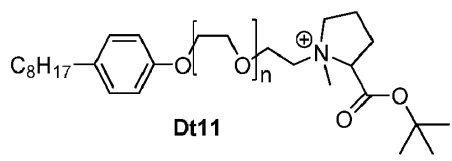
(no forma parte de la presente invención)



(no forma parte de la presente invención)

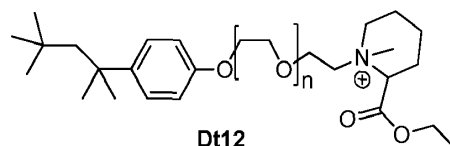


(no forma parte de la presente invención)



y

5 (no forma parte de la presente invención)



10 (no forma parte de la presente invención)

donde n es como se ha descrito anteriormente. En determinadas realizaciones, cada n es independientemente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 15, 20, 25 o 30.

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

Se ensayó también Dt1 utilizando cebadores del gen de Rodopsina para amplificar aproximadamente los amplicones de 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 la 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 extensión durante diez minutos a 72 °C. La amplificación soportada por Dt1 de Rhod-3920 y Rhod-4181 cuando se incluyó en la reacción de 50 µl a una concentración de entre 0,008 % y 0,001 %. La amplificación soportada por Dt1 de Rhod-4089 cuando se incluyó en la reacción de 50 µl a una concentración de entre 0,008 % y 0,001 %.

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

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

La **Figura 6** compara la actividad de Dt1 y Dt2. Como se muestra en la misma, 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 0,04 % a 0,001 %. Se muestra que Dt2 soporta la amplificación cuando se incluye en la mezcla de reacción a una concentración de 0,04 a 0,006 %.

Las **Figuras 7 y 8** proporcionan una comparación entre Dt4 y Tween® 20 en la amplificación de cuatro dianas distintas (B2M, GAPDH, RPLPO y GUSB). Como se muestra en las mismas, 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 en la amplificación de varias dianas distintas. Como se muestra en la misma, 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 en la misma, la amplificación fue soportada por cada detergente en el nivel más alto por Dt4 seguido de Dt1, aunque, en las condiciones de reacción de este experimento. Dt5 y Dt7 presentaron una actividad similar, seguida de Dt6.

Las **Figuras 11-15** muestran gráficos de amplificación que comparan la actividad de Dt4 a Brij-58 y Tween® 20 a diversas concentraciones en la amplificación de HPRT1 o PPIA. Como se muestra en las mismas, Dt4 soporta la

reacción de amplificación de una manera comparable a Brij-58 y Tween® 20 en todas las concentraciones ensayadas (0,001 % a 0,0001 %).

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

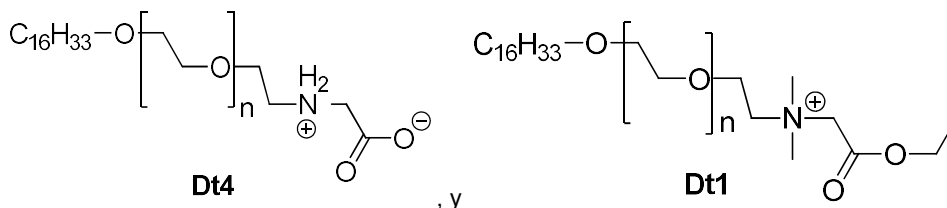
Las **Figuras 19 y 20** demuestran que Dt4 es estable (es decir, conserva su capacidad para soportar la amplificación) en “5X” regulador (Tris (pH 8,0), KCl y BSA) durante al menos dos meses.

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

La **Figura 23** ilustra que Dt4 soporta la amplificación en una variedad de ensayos de TaqMan®.

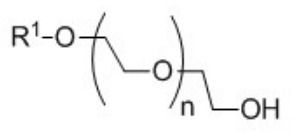
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



2. Un método para producir un detergente modificado según la reivindicación 1, que comprende:

a) combinar secuencialmente



yoduro de metiltrifenoxifosfonio y N,N-dimetilformamida para producir una mezcla;

b) agitar la mezcla durante un período de tiempo suficiente en una atmósfera adecuada a una temperatura adecuada para producir una mezcla de producto intermedio;

c) añadir una sal de clorhidrato de éster de aminoácido y Et₃N a la mezcla de producto intermedio;

d) enfriar la mezcla de c) a una temperatura adecuada y concentrar la misma para producir una mezcla concentrada bruta;

e) fraccionar la mezcla concentrada bruta mediante HPLC preparativa; y

f) combinar y concentrar las fracciones deseadas para aislar el detergente modificado,

en donde 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 fenilo sustituido está sustituido por al menos un alquilo (C₁-C₃₀), alquilo (C₁-C₃₀) sustituido, heteroalquilo (C₁-C₃₀) o heteroalquilo (C₁-C₃₀) sustituido; y n es 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.

3. El método de la reivindicación 2, que comprende además someter las fracciones de la etapa (f) a hidrólisis.

4. El método de la reivindicación 2 o 3, que comprende además neutralizar el producto.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el producto se neutraliza utilizando Amberlite®.

Titulación de Dt1 y Dt2 a 1:1 concentraciones distintas utilizando productos de PCR de 1Kb y 3Kb

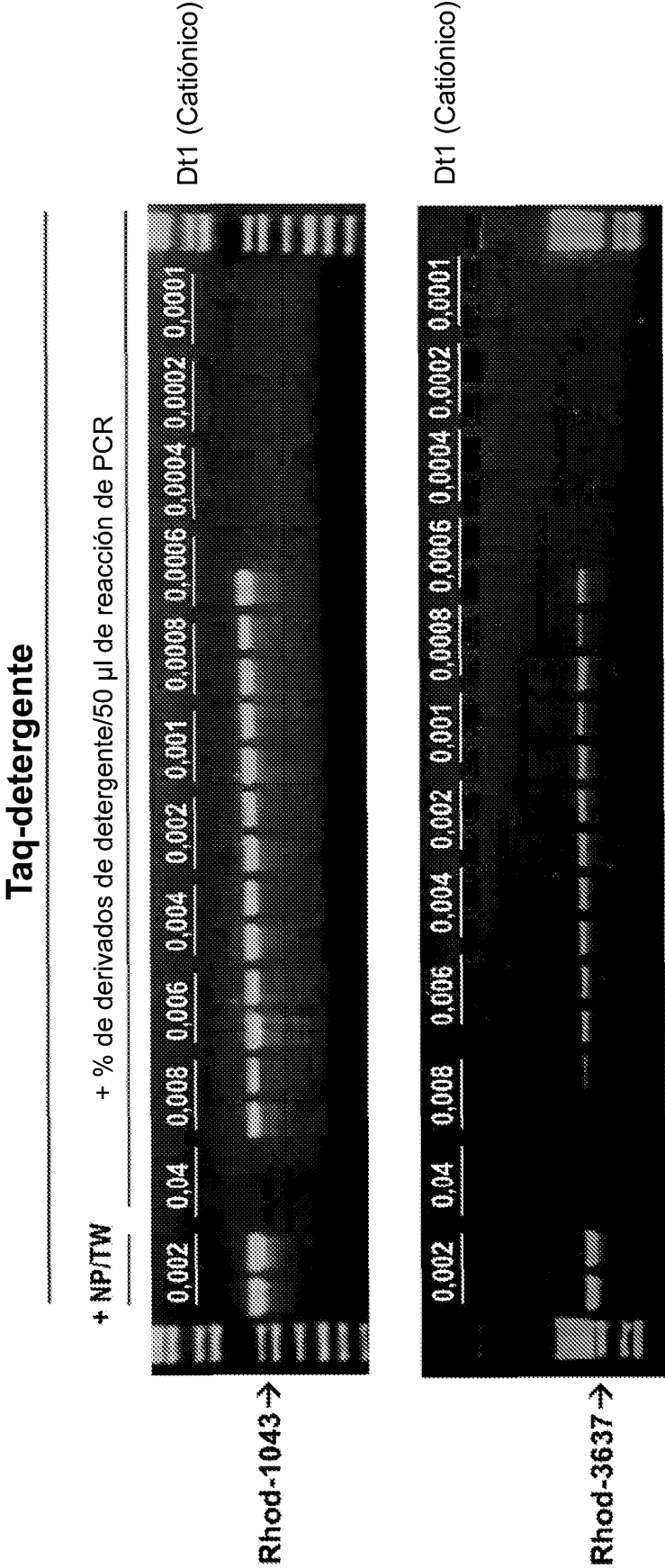


Figura 1-1

Titulación de Dt1 y Dt2 a 11 concentraciones distintas utilizando productos de PCR de 1Kb y 3Kb

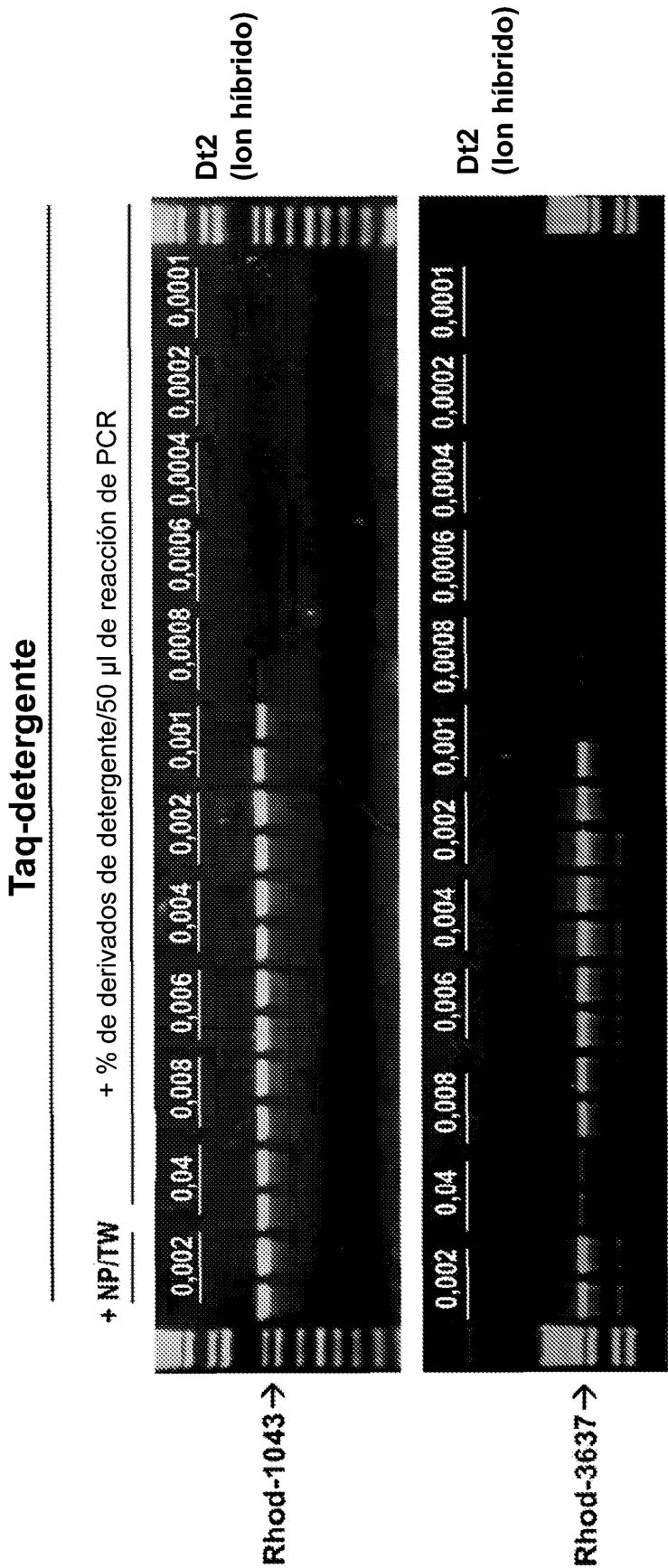
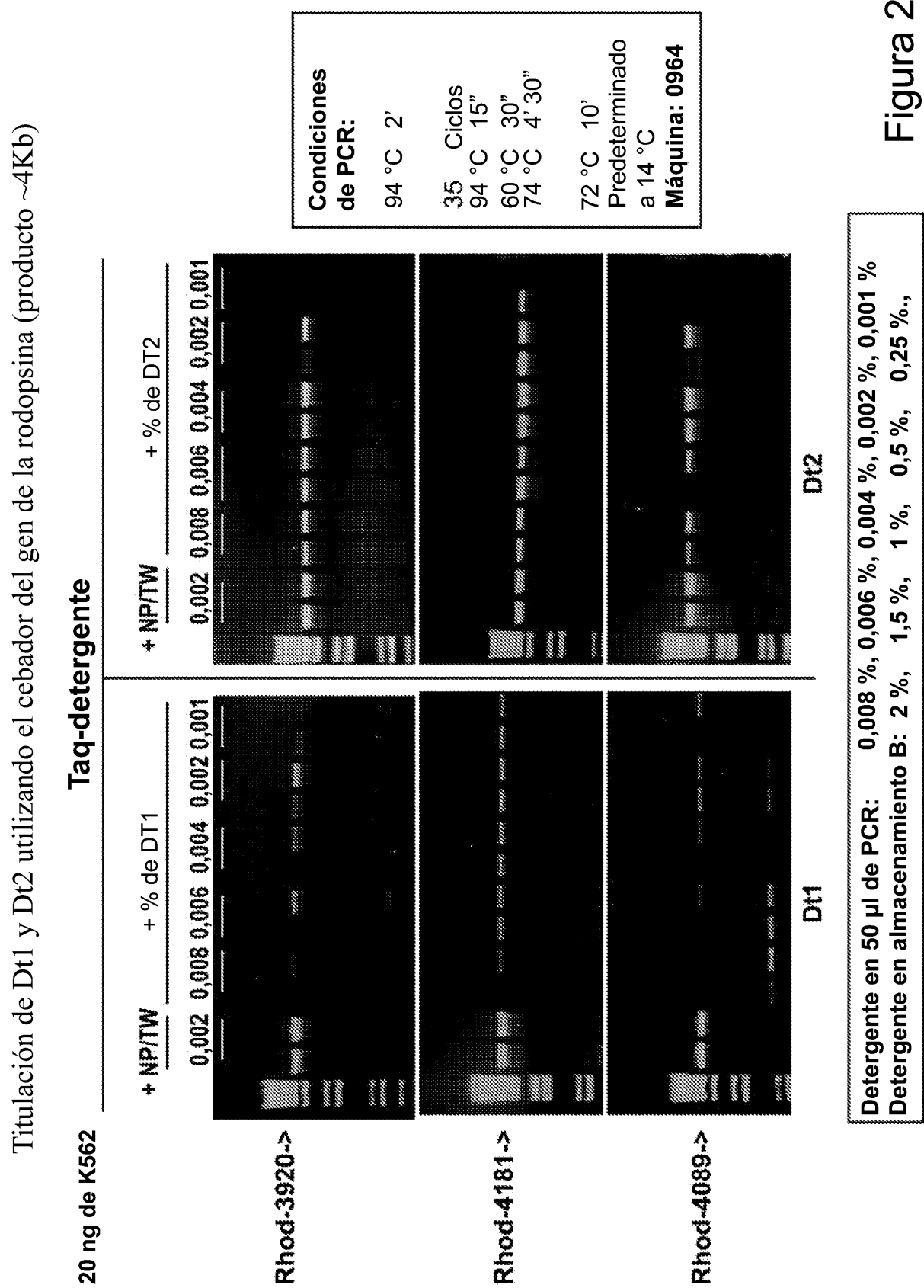


Figura 1-2



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

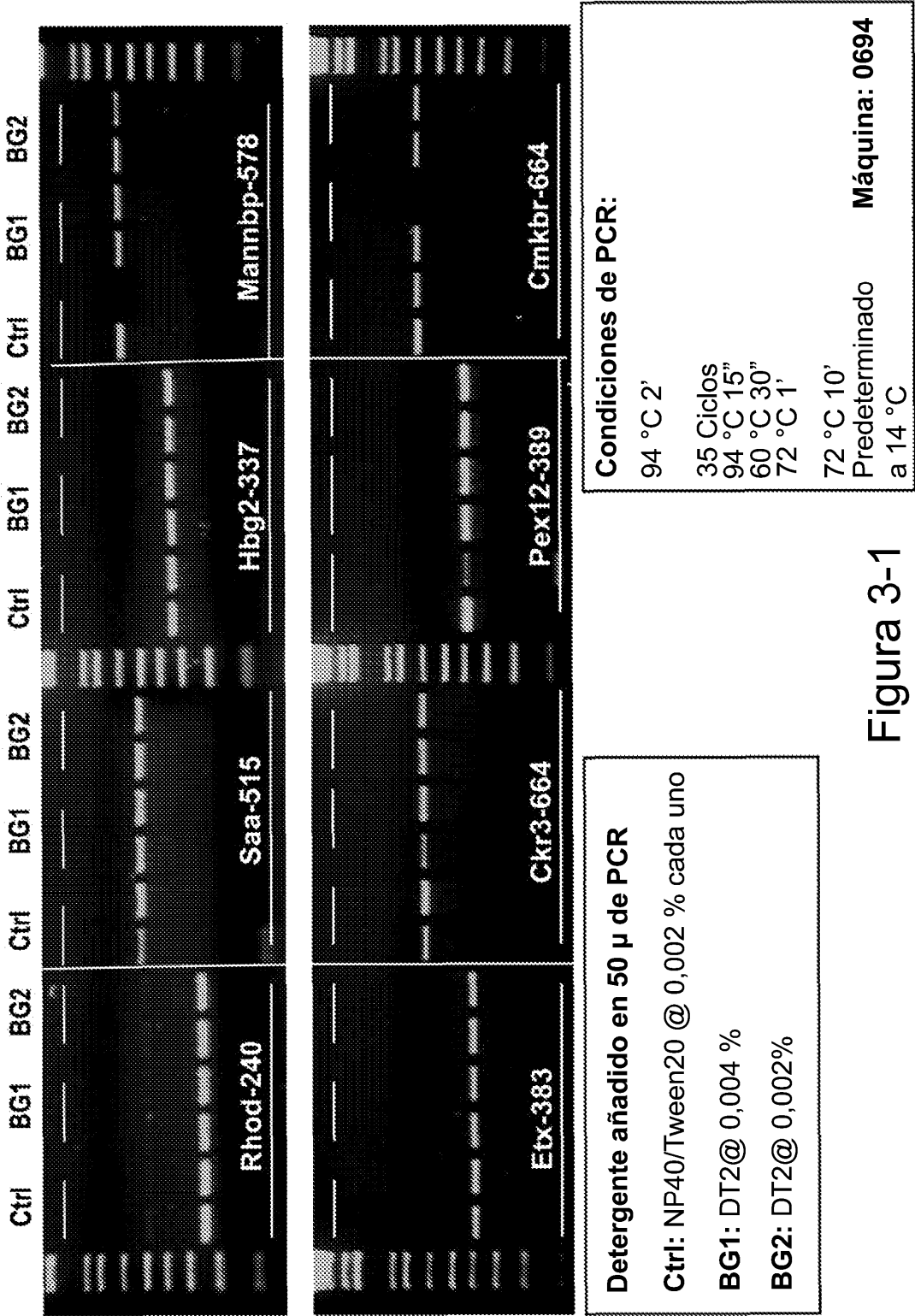


Figura 3-1

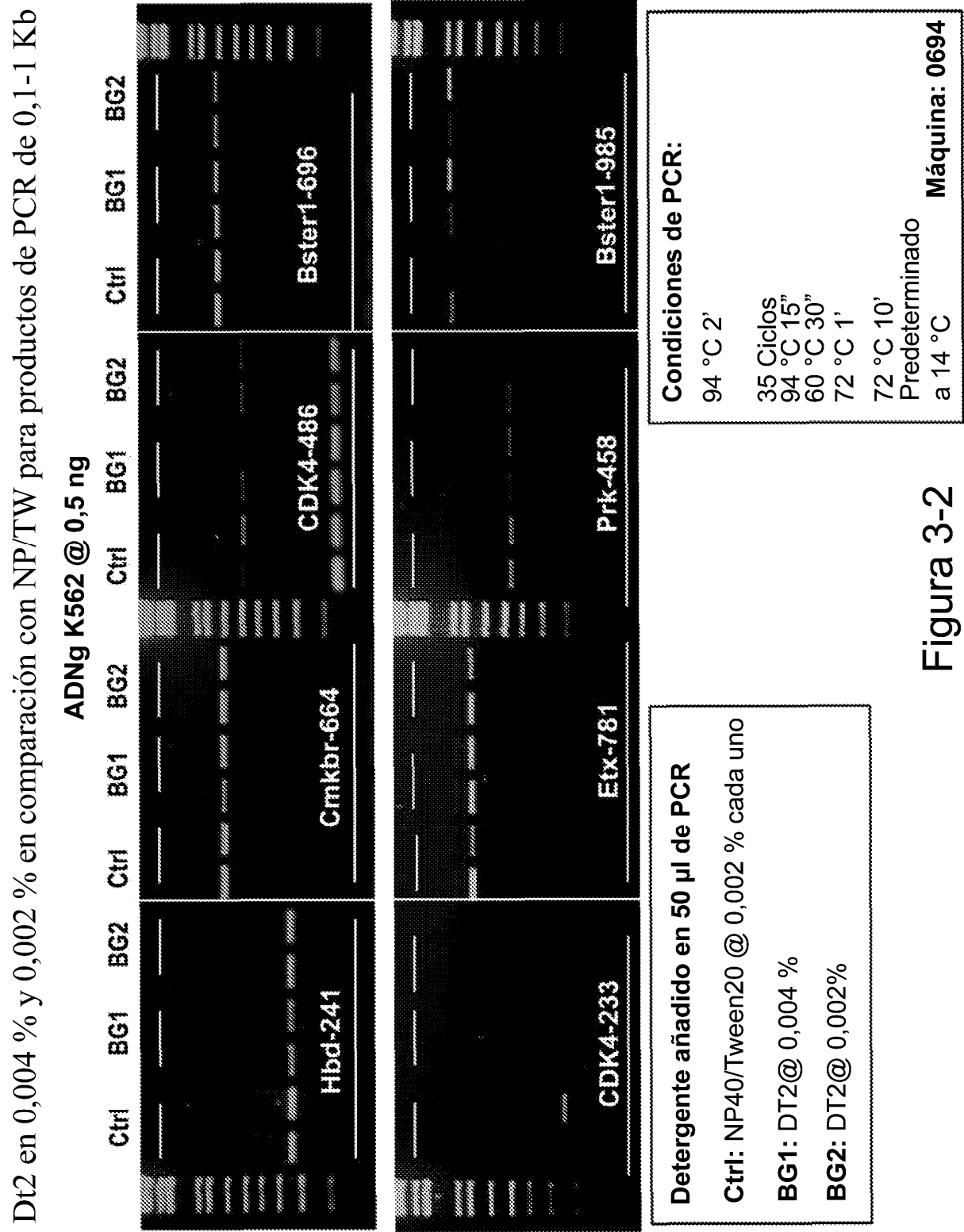


Figura 3-2

Dt2 en 0,004 % y 0,002 % en comparación con NP/TW para los productos de PCR de 1-2 Kb

ADNg K562 @ 0,5 ng

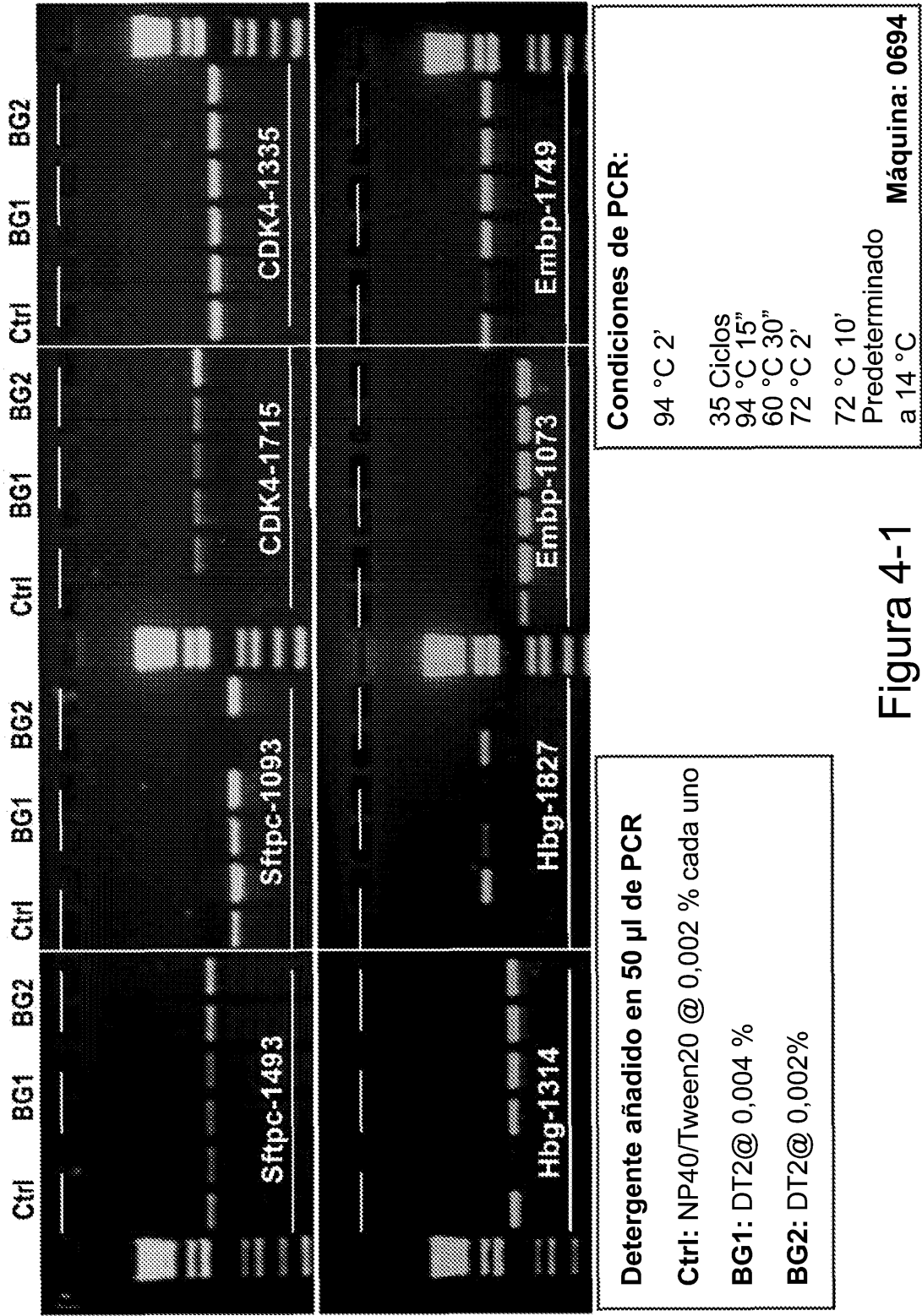


Figura 4-1

Dt2 en 0,004 % y 0,002 % en comparación con NP/TW para los productos de PCR de 1-2 Kb

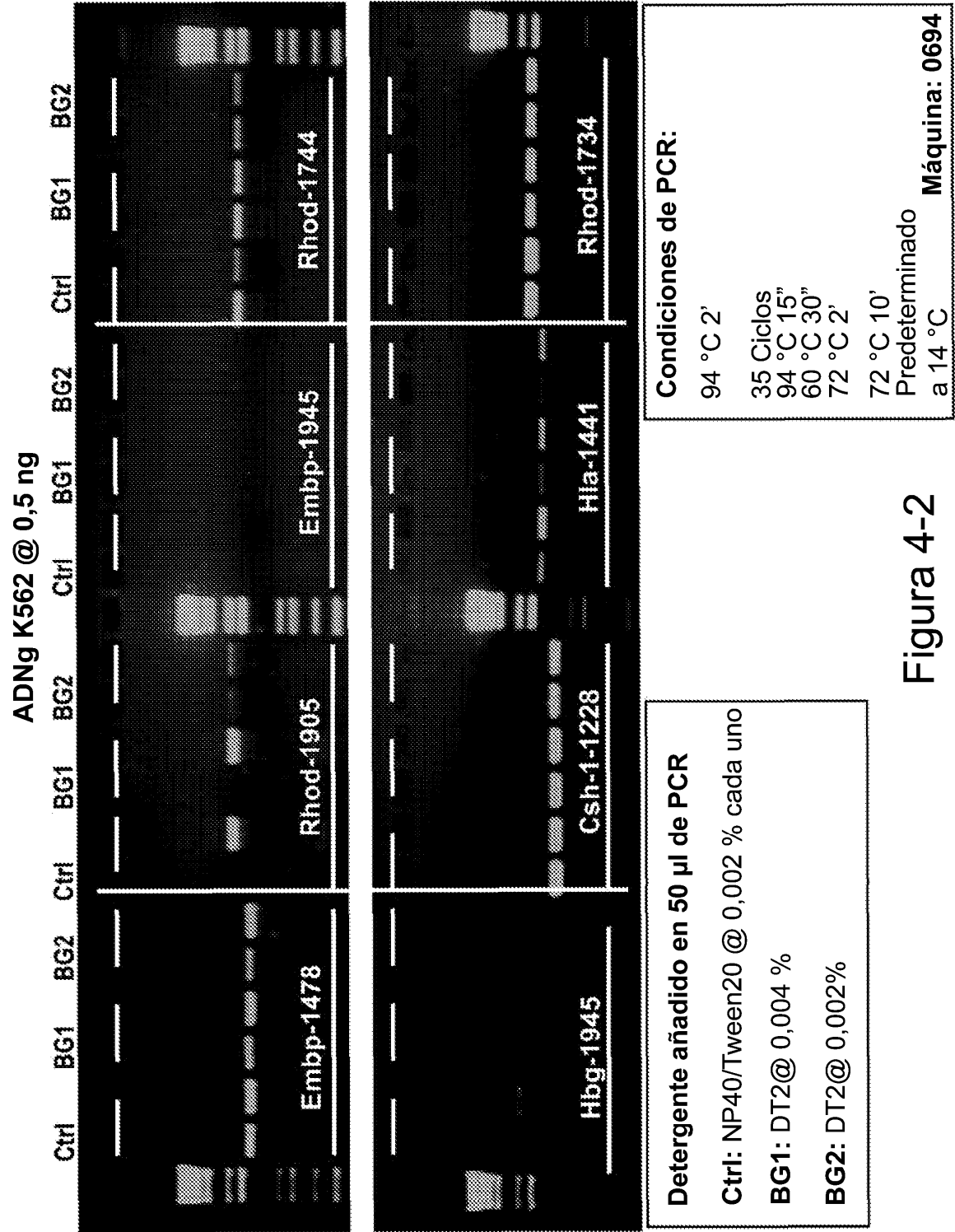


Figura 4-2

Actividad de PCR Comparación de Brij58 solo con Dt2

Taq-detergente

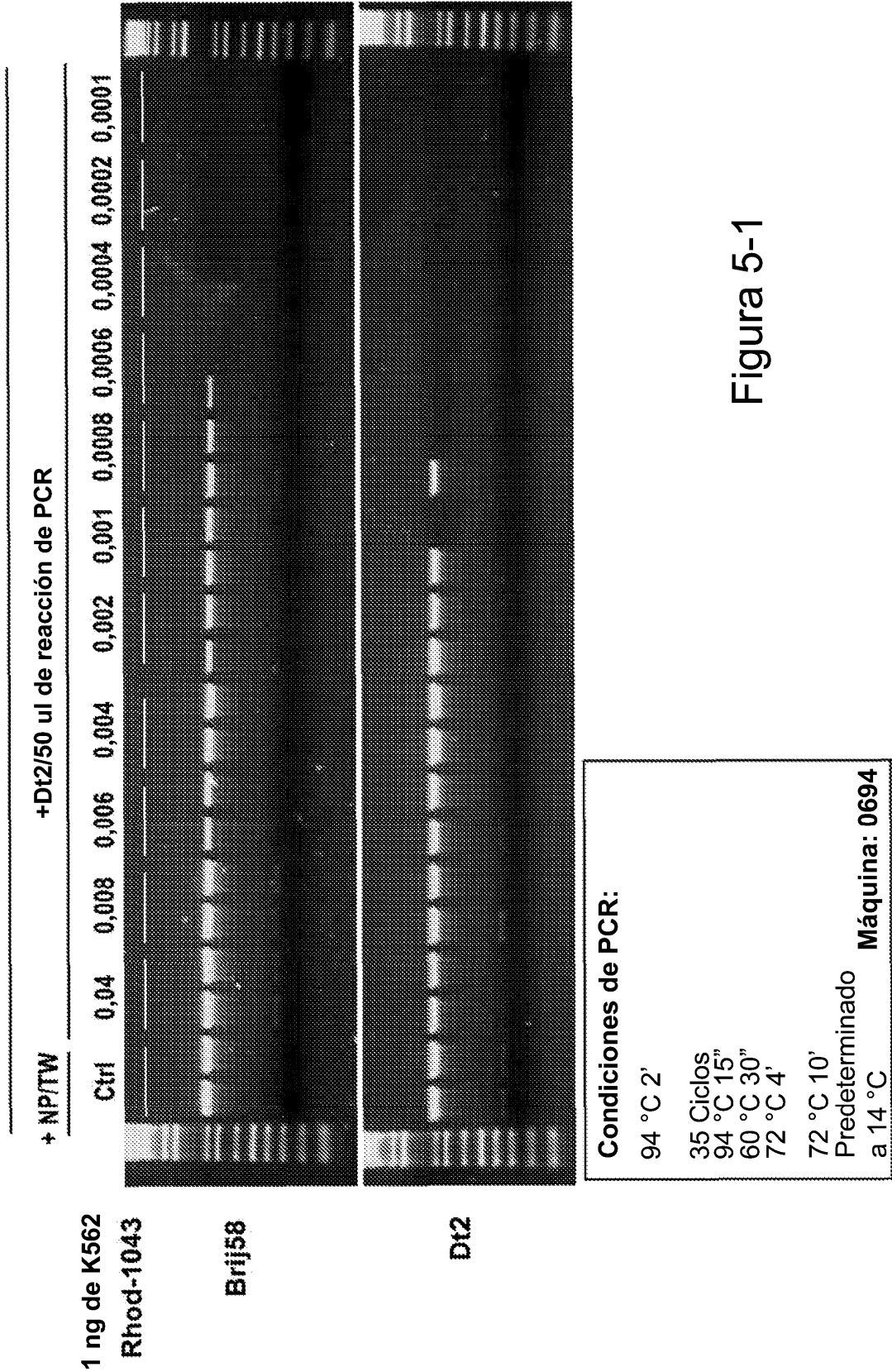


Figura 5-1

Actividad de PCR Comparación de Brij58 solo con Dt2

Taq-detergente

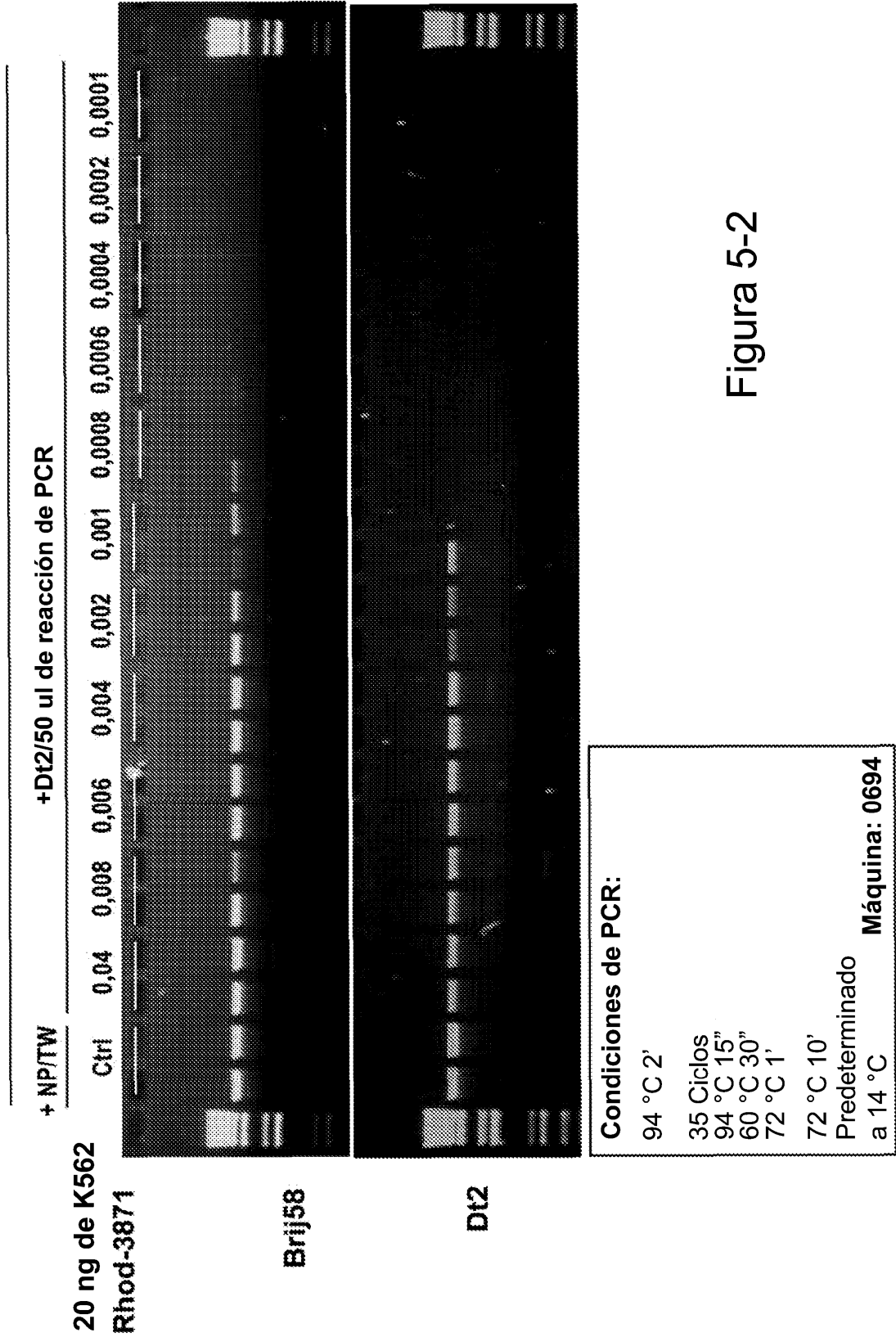


Figura 5-2

Titulación de Dt2 y Dt4 utilizando Rodopsina-1043

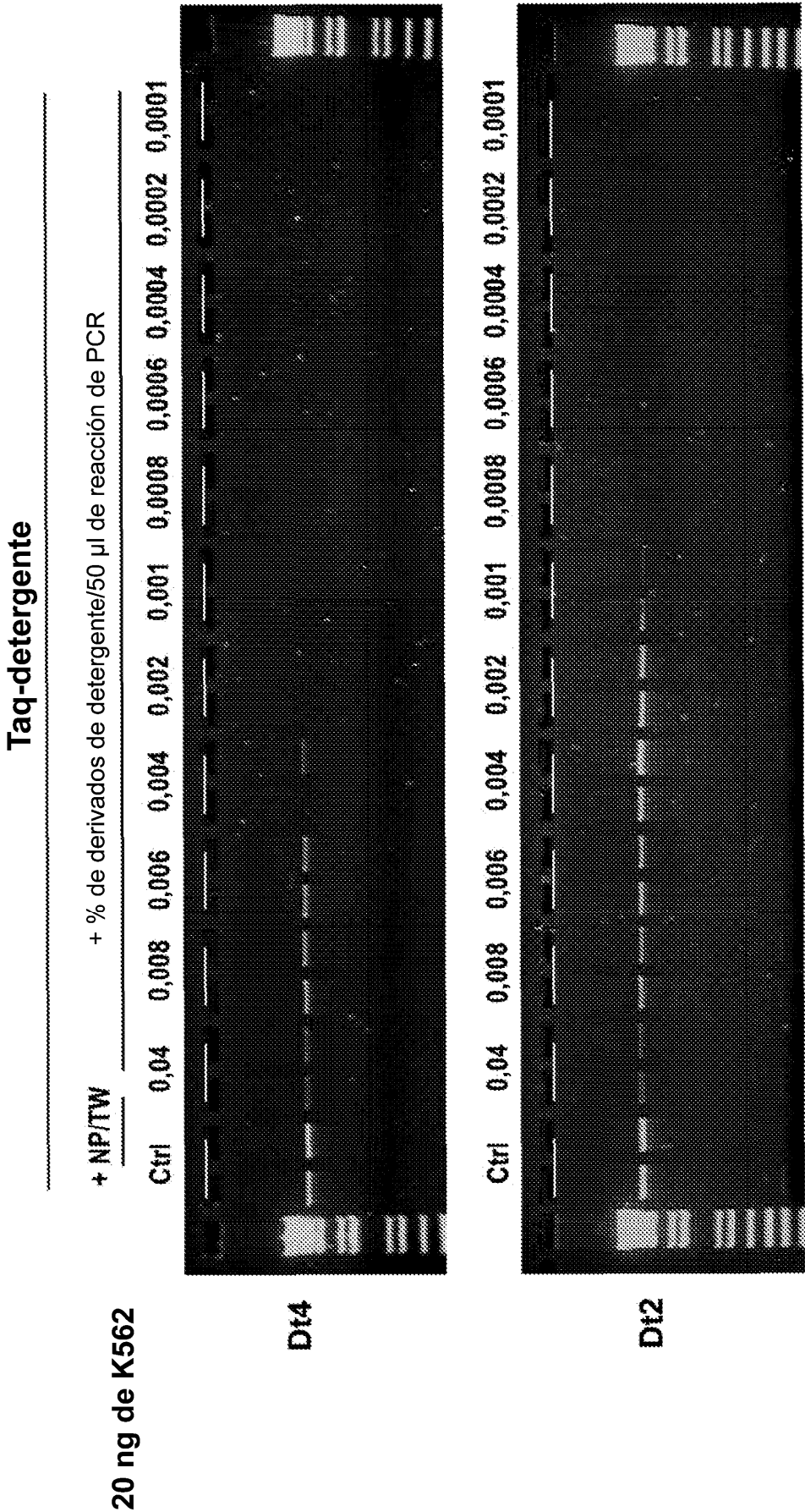


Figura 6

Derivado de detergente Dt4 comparado con Tween20

Gráfico de amplificación

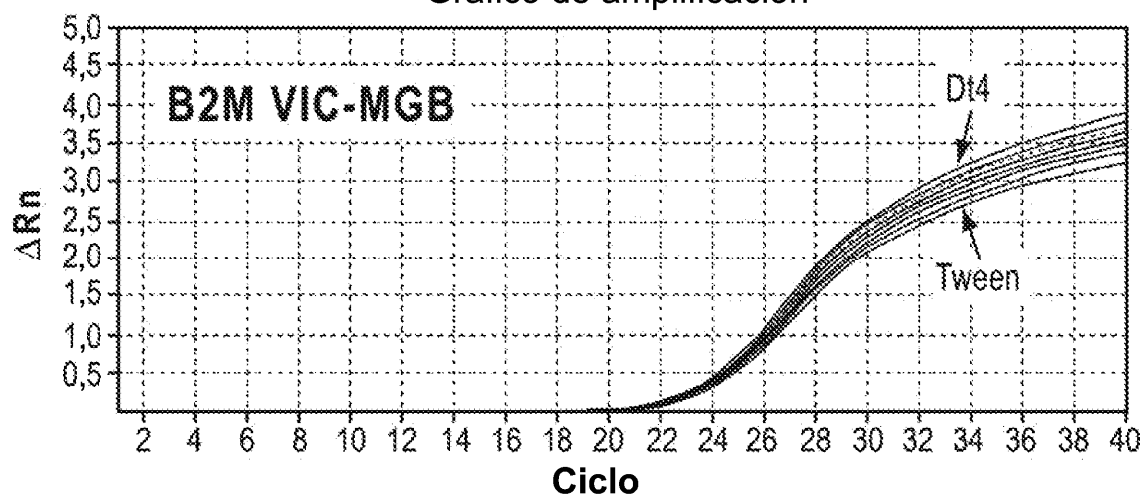


Figura 7-1

Derivado de detergente Dt4 comparado con Tween20

Gráfico de amplificación

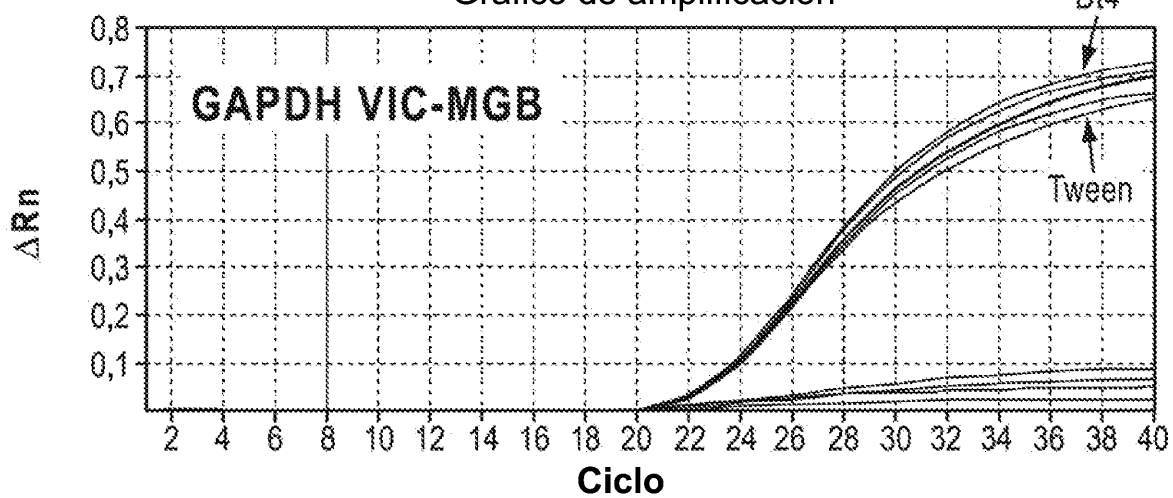


Figura 7-2

Derivado de detergente Dt4 comparado con Tween20

Gráfico de amplificación

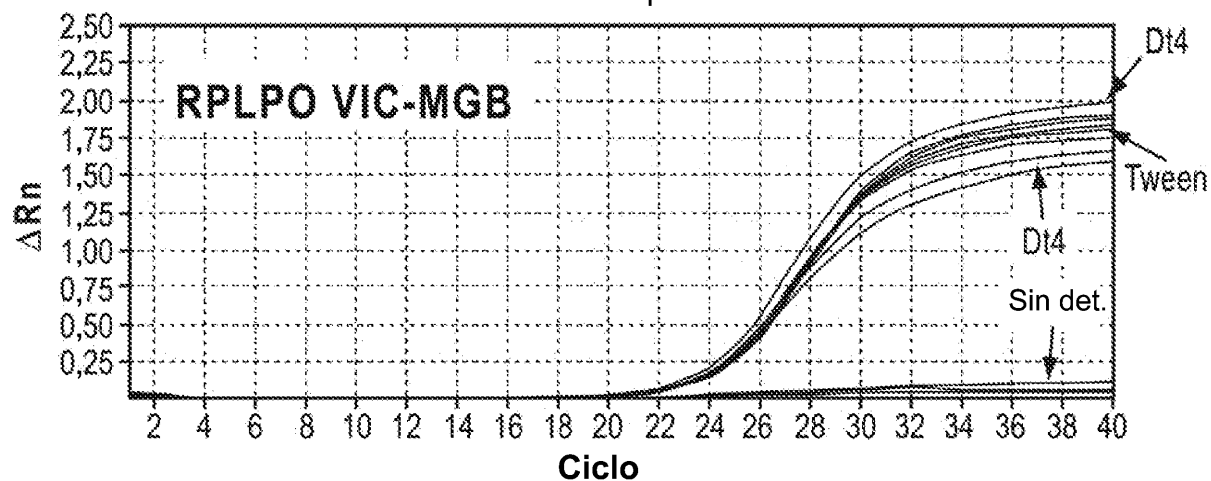


Figura 7-3

Derivado de detergente Dt4 comparado con Tween20

Gráfico de amplificación

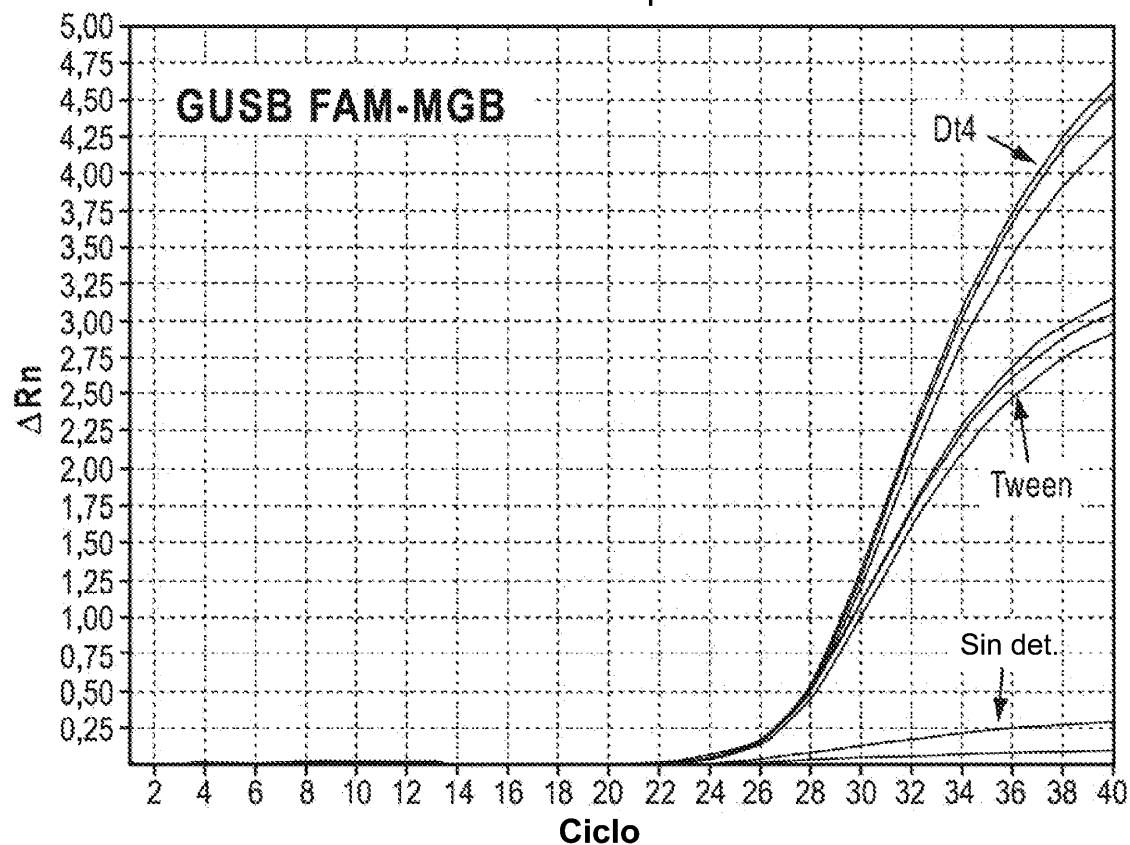


Figura 7-4

Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween20, escala logarítmica

Gráfico de amplificación

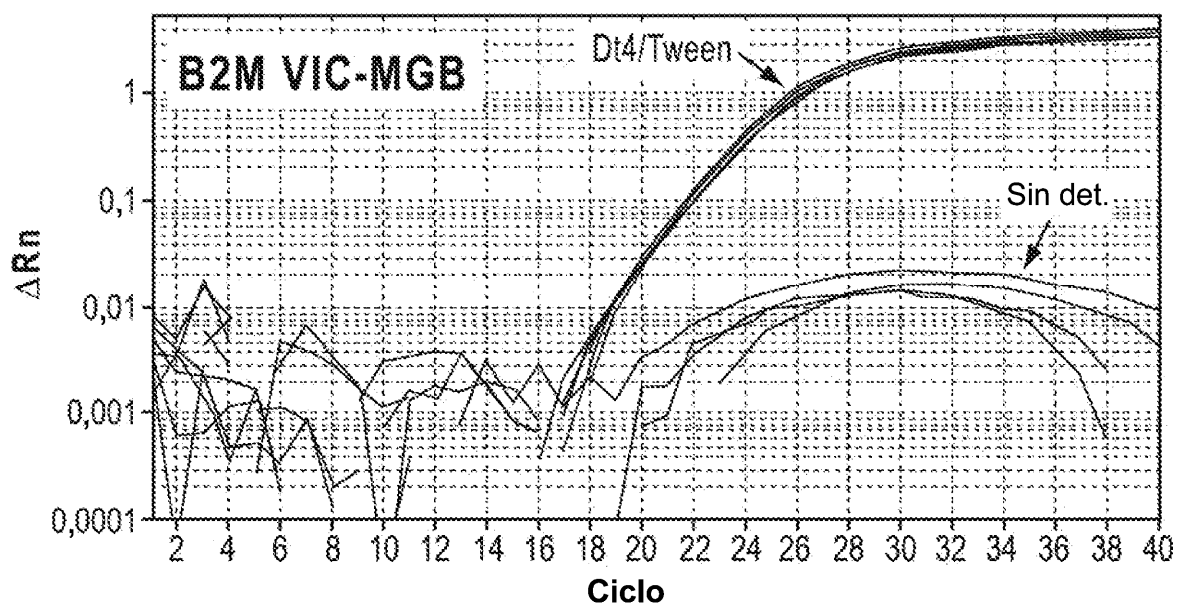
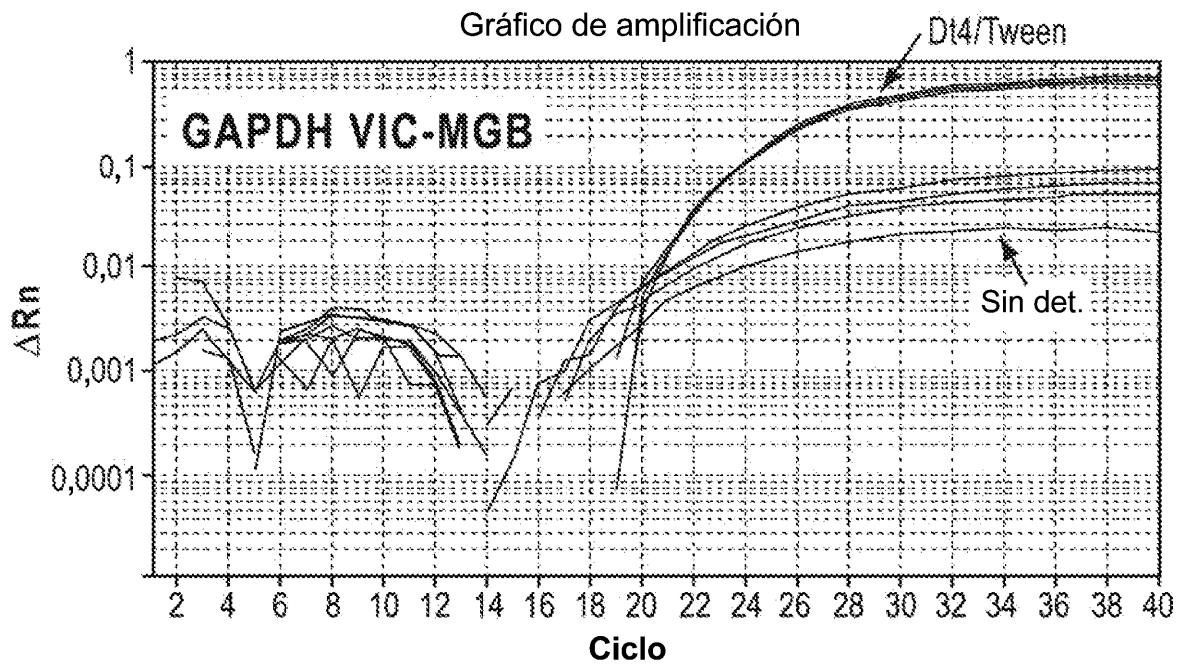
**Figura 8-1****Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween20, escala logarítmica**

Gráfico de amplificación

**Figura 8-2**

Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween20, escala logarítmica

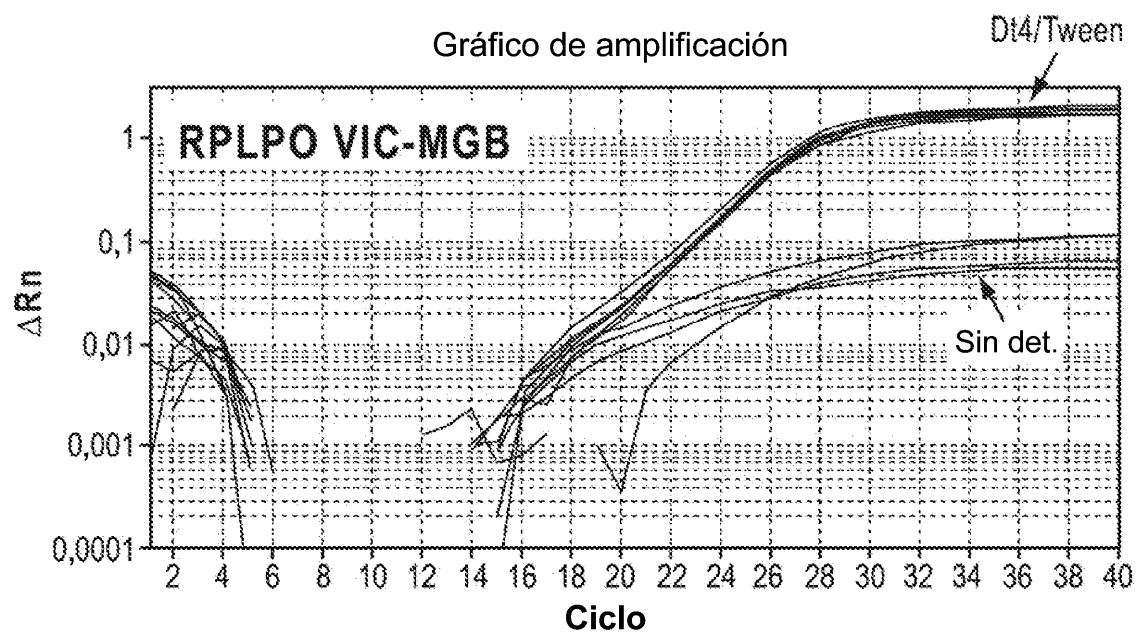


Figura 8-3

Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween20, escala logarítmica

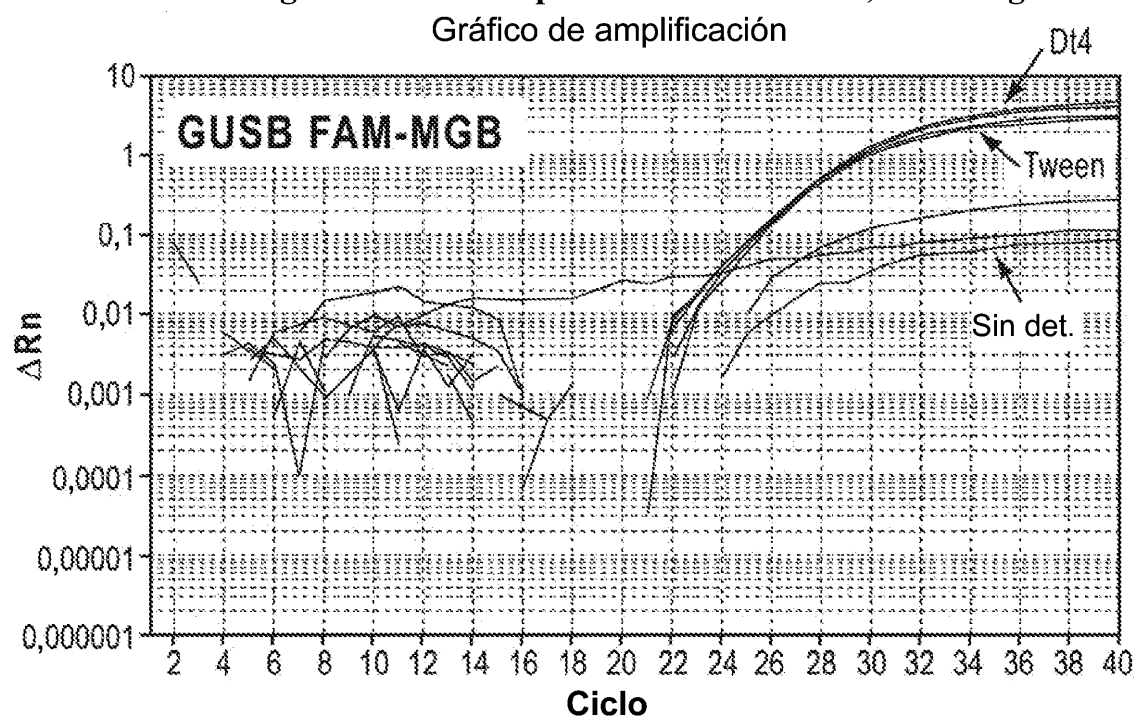


Figura 8-4

Derivado de detergente Dt4 en comparación con Tween 20

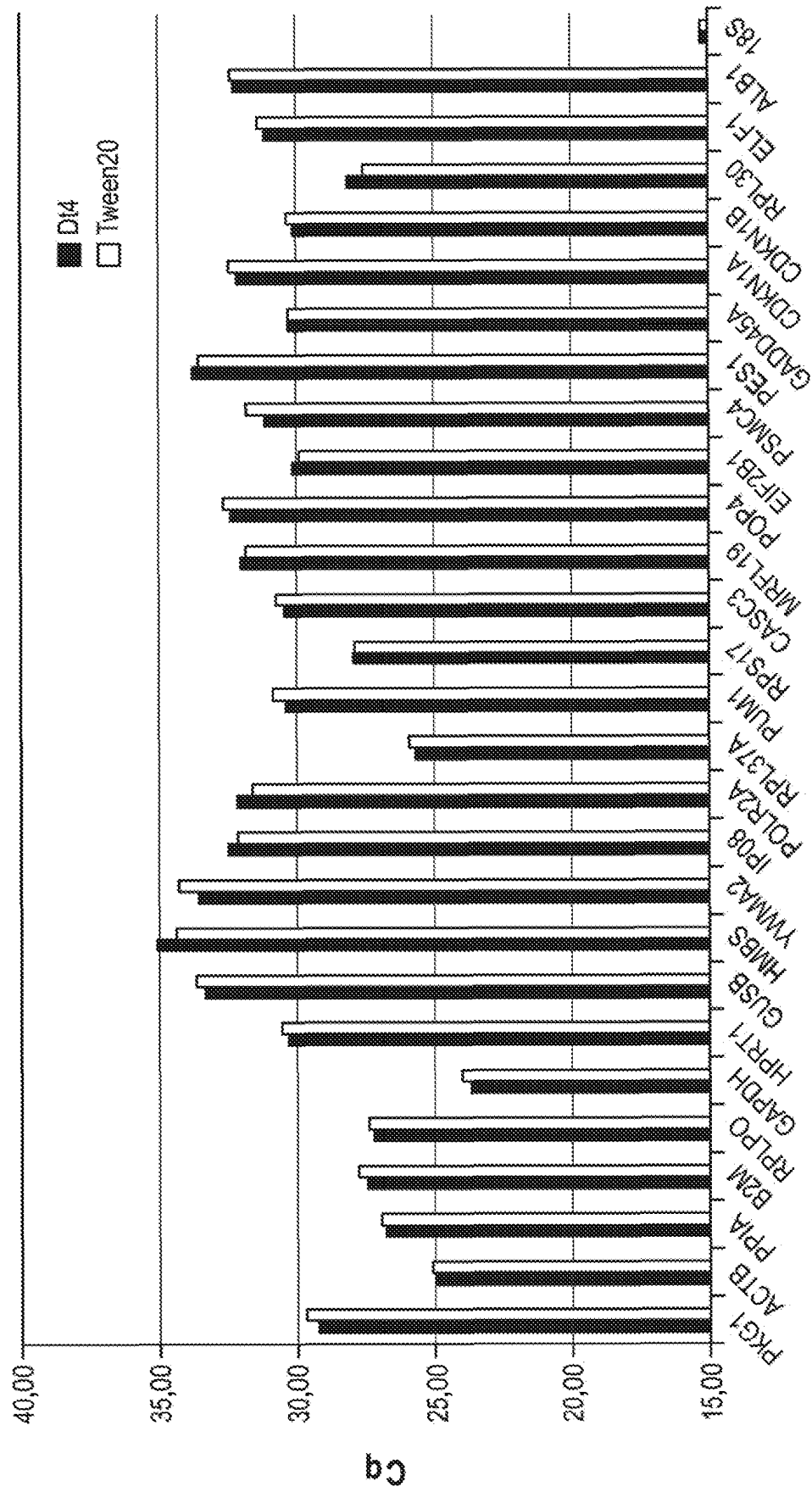
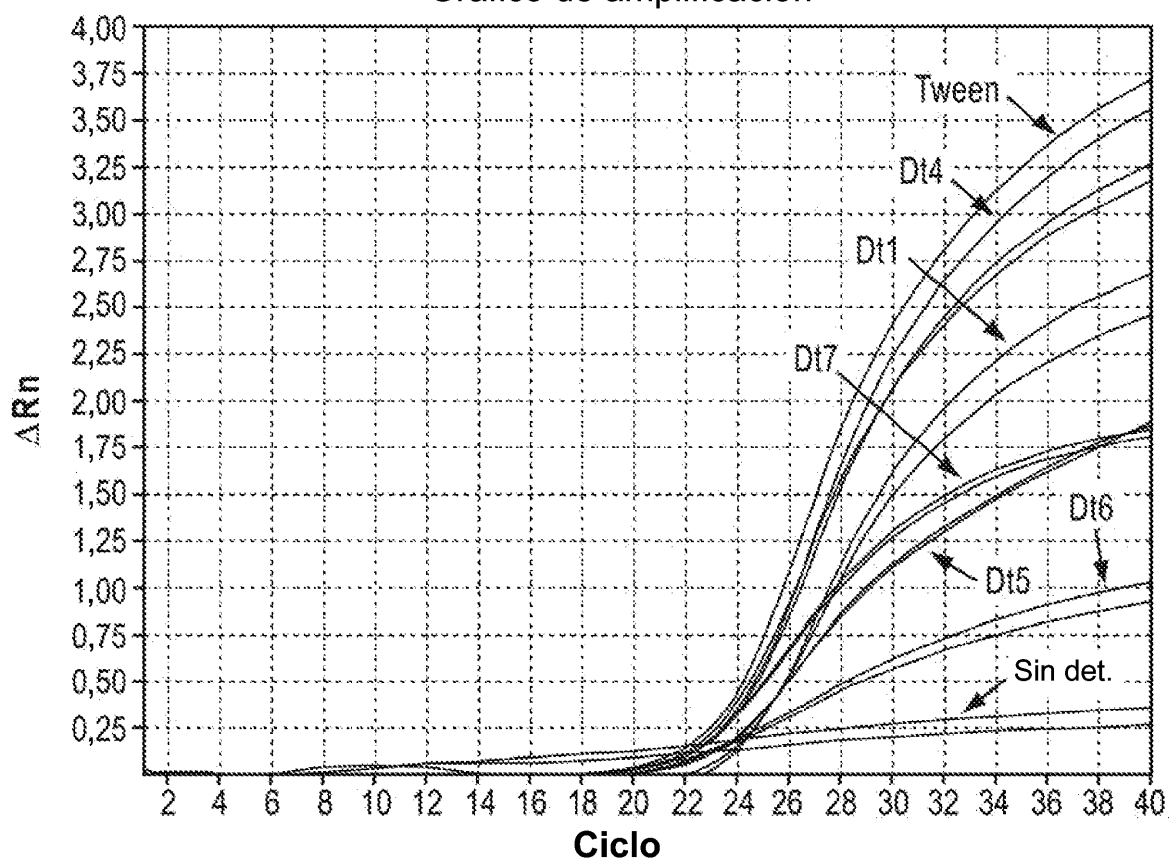


Figura 9

Derivado de detergente en comparación con Tween20

Gráfico de amplificación



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

Figura 10

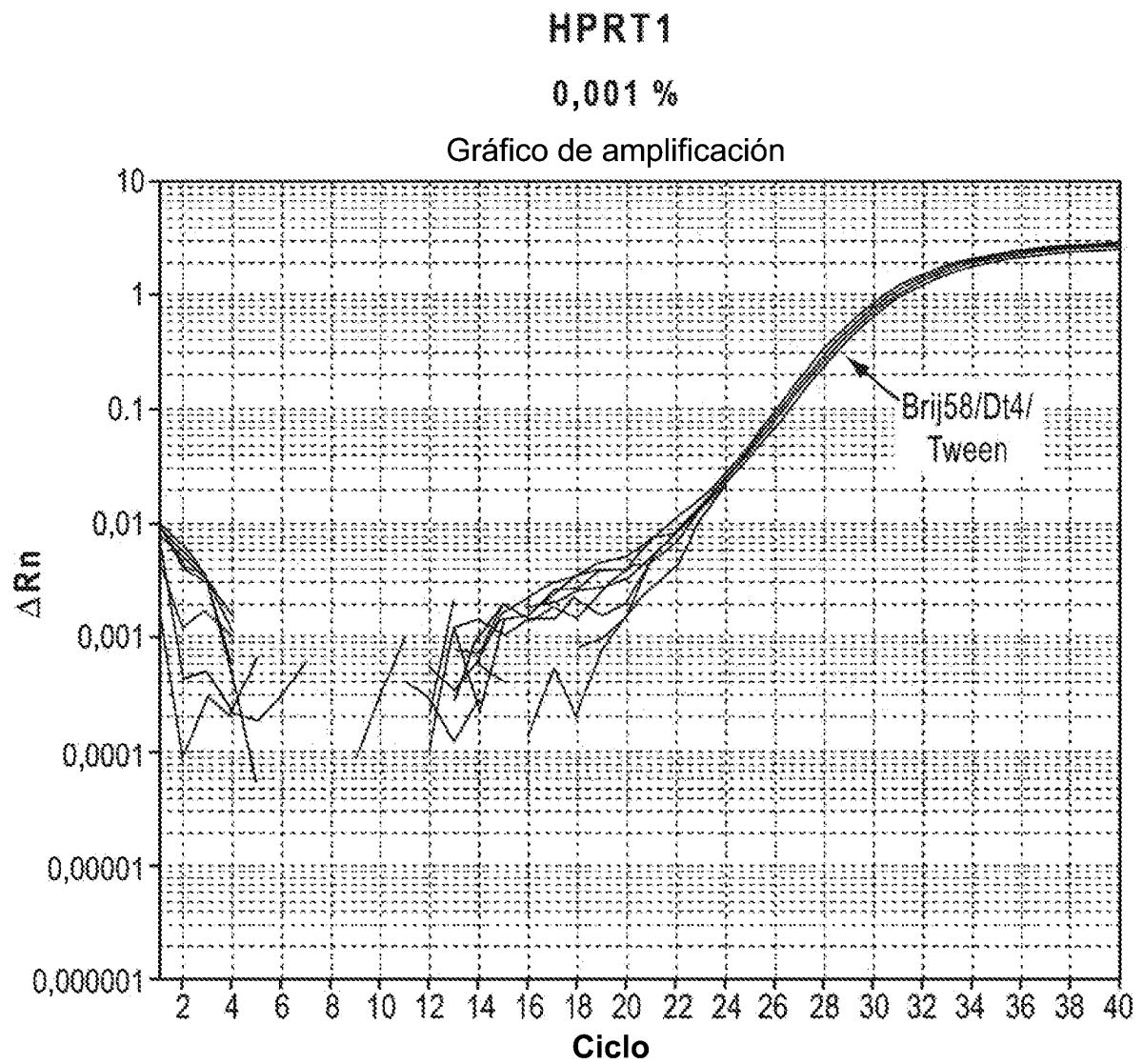


Figura 11-1

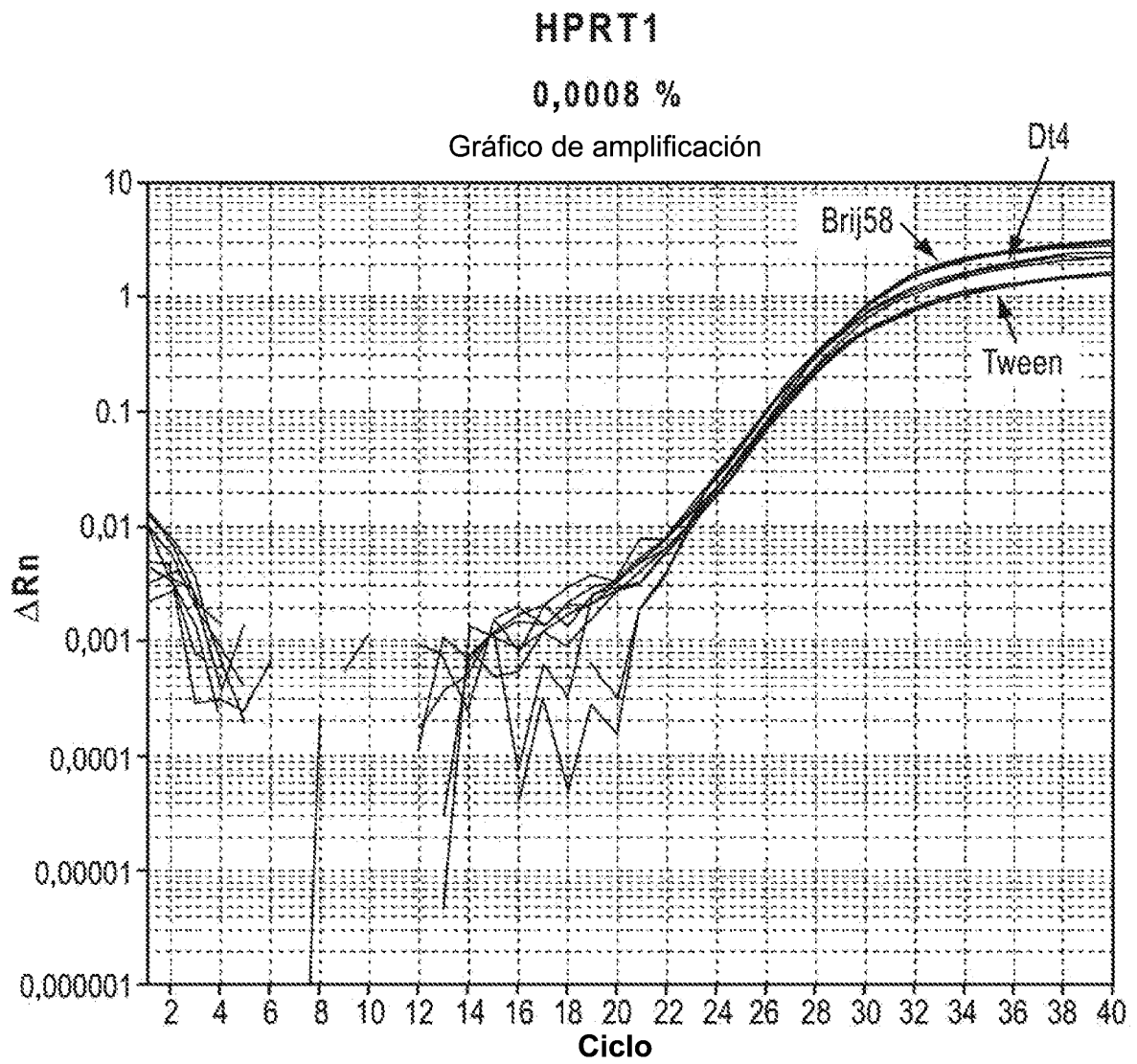


Figura 11-2

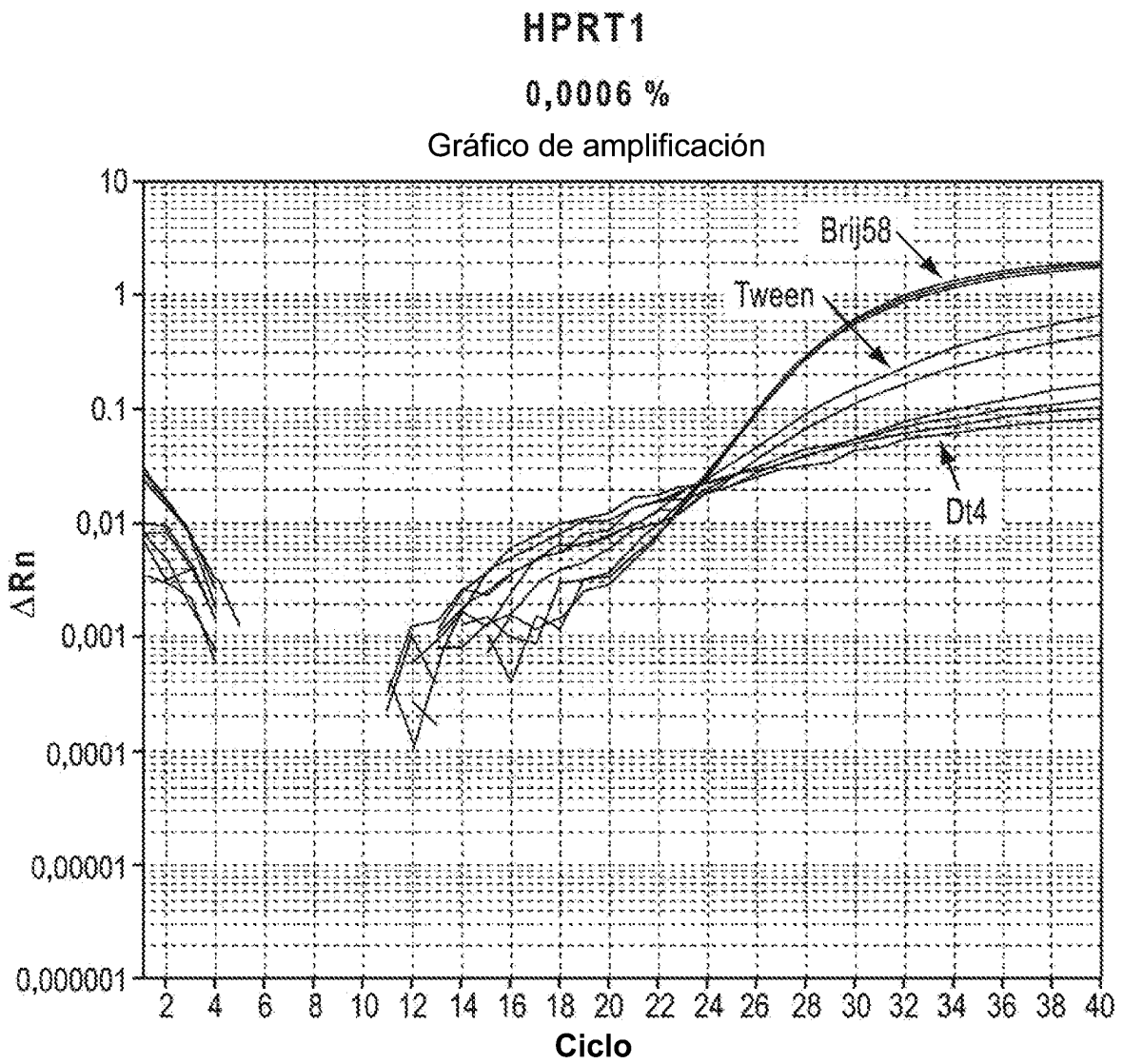


Figura 12-1

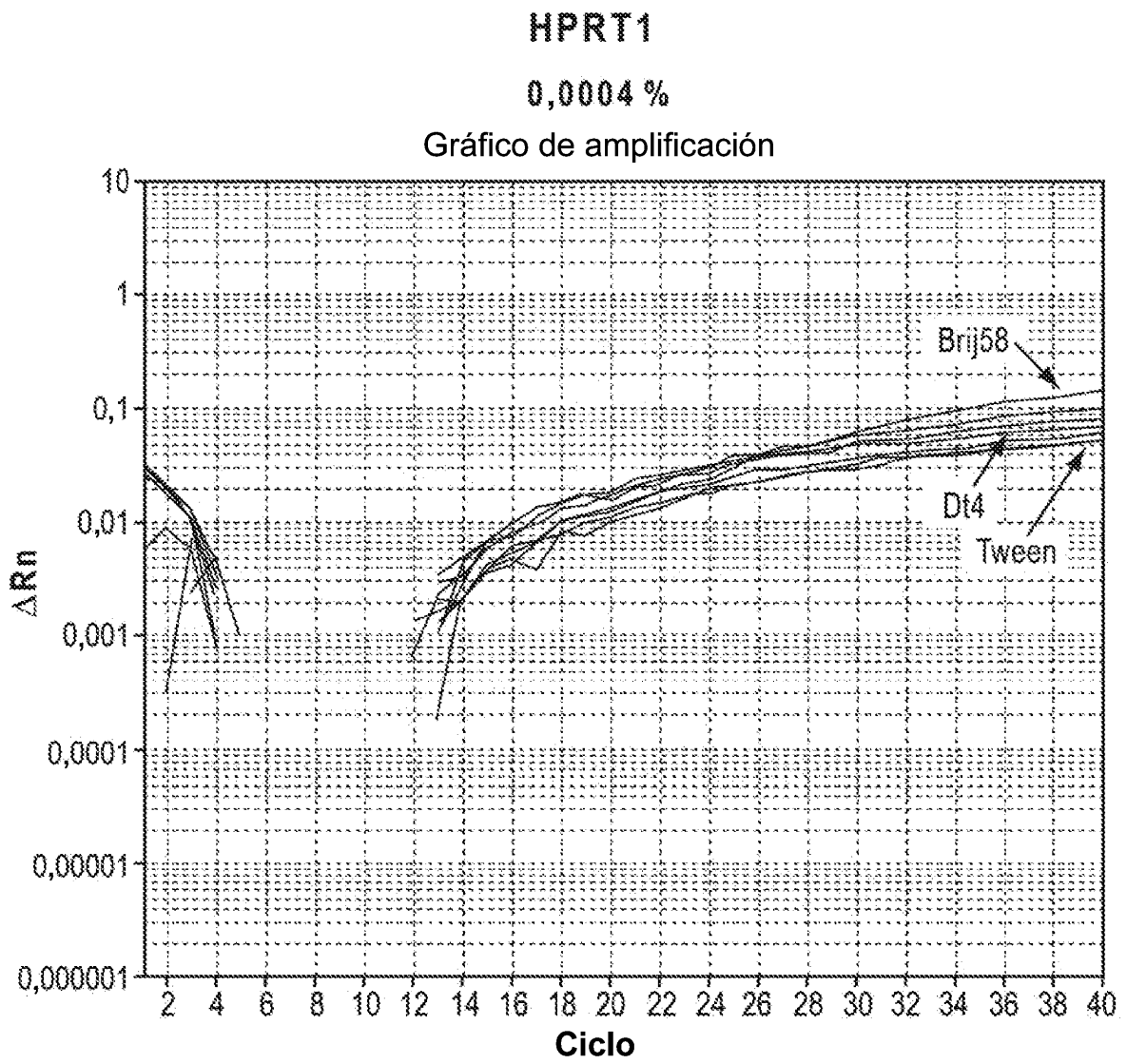


Figura 12-2

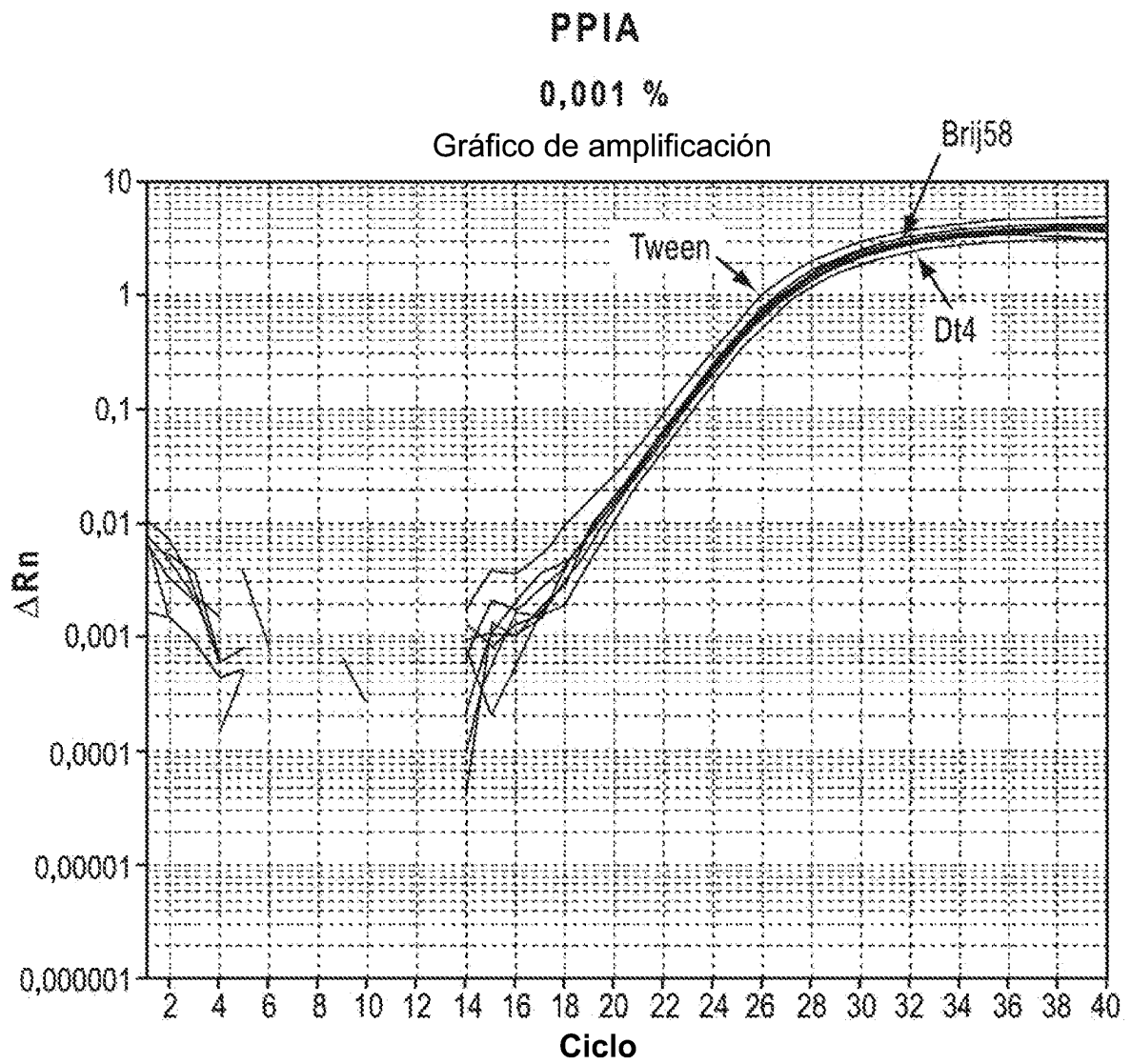


Figura 13-1

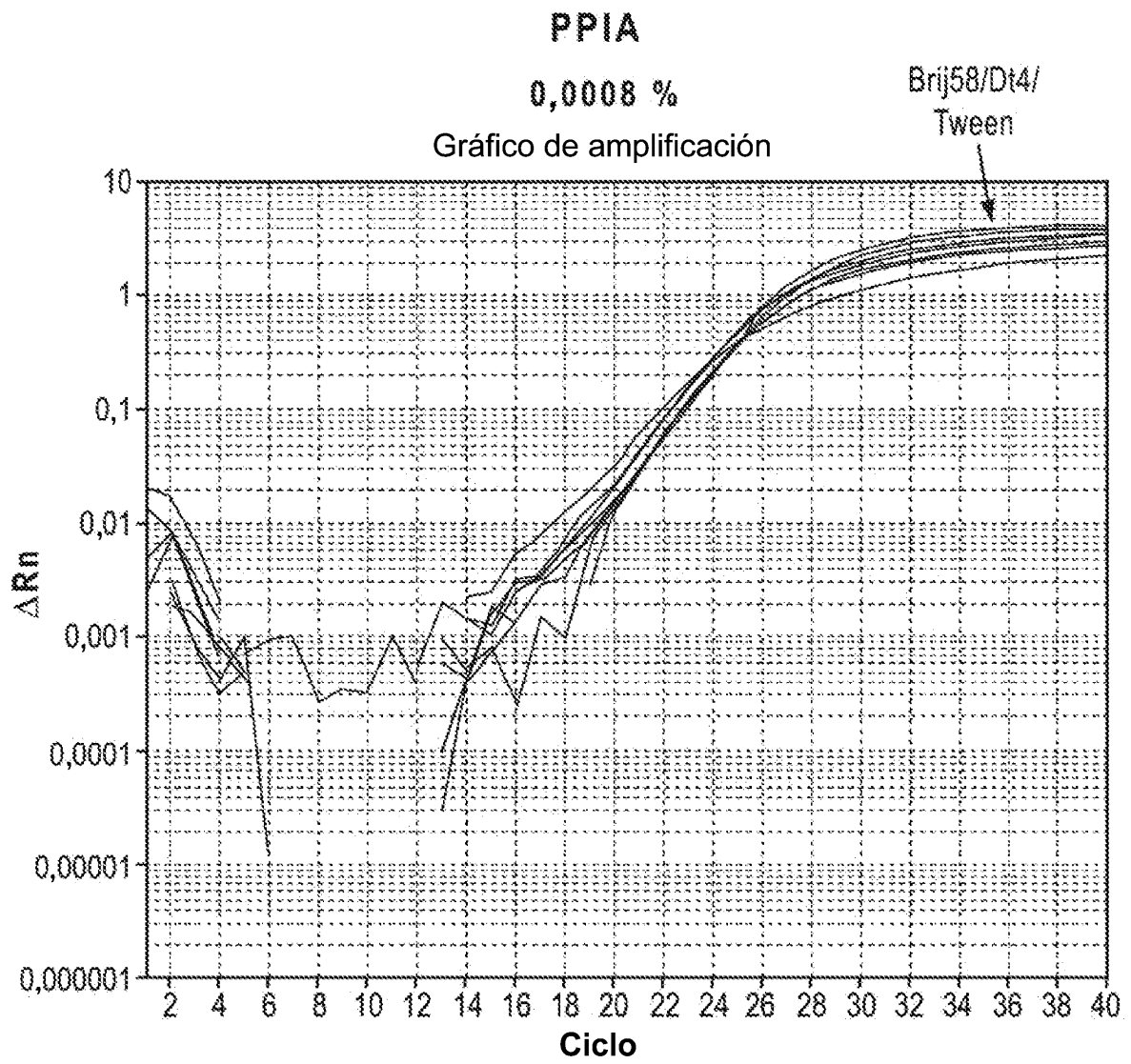


Figura 13-2

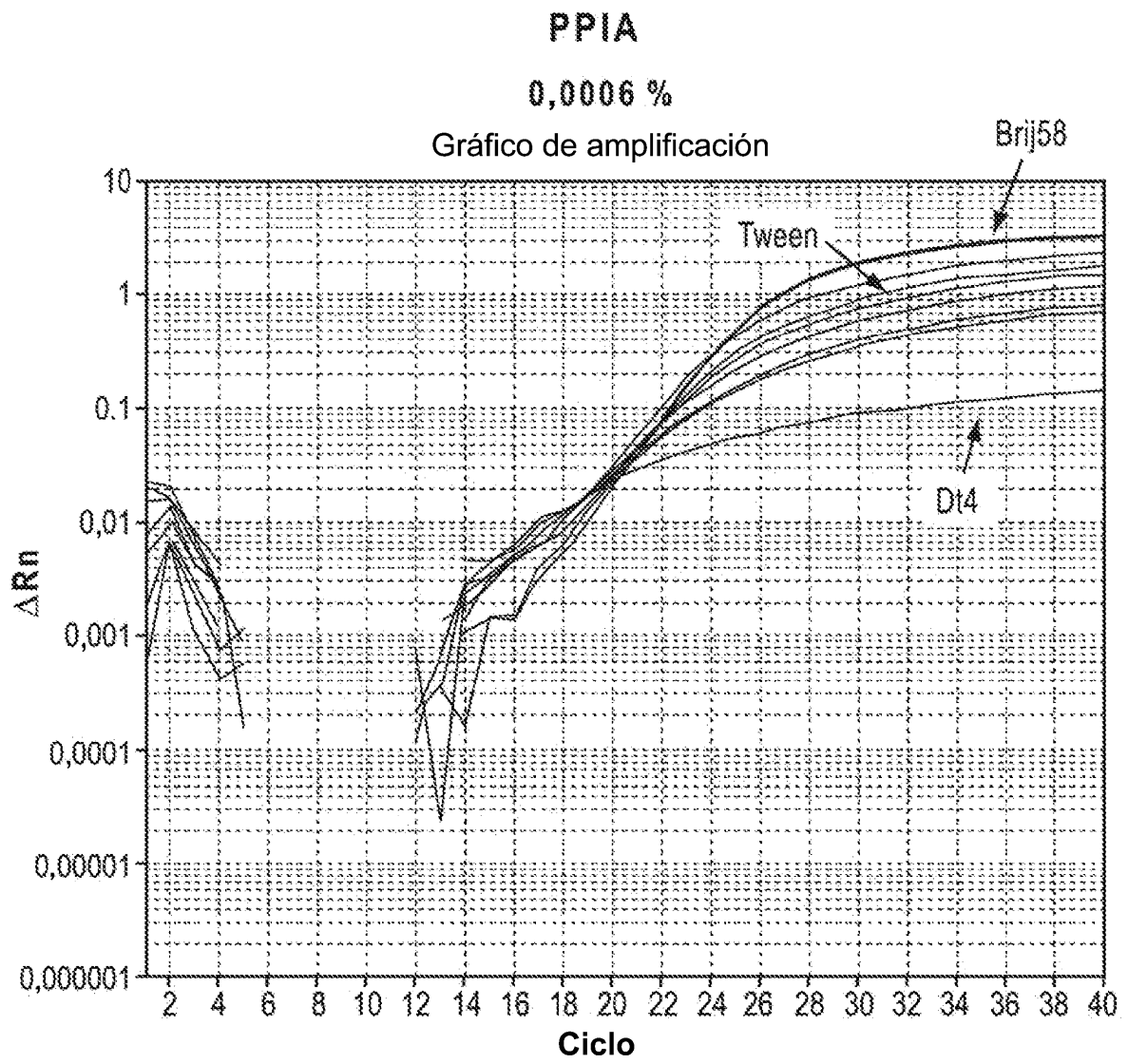


Figura 14-1

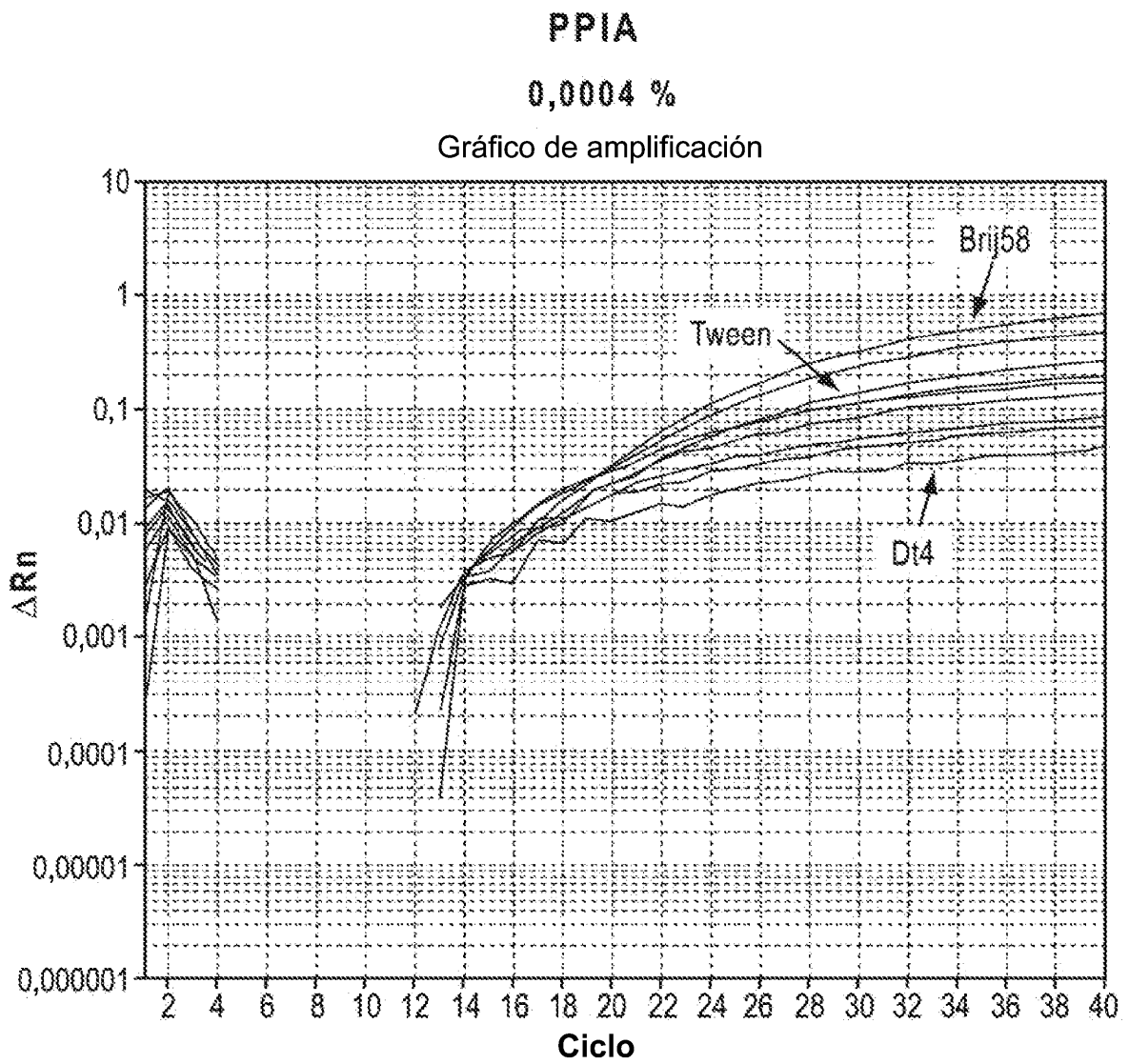


Figura 14-2

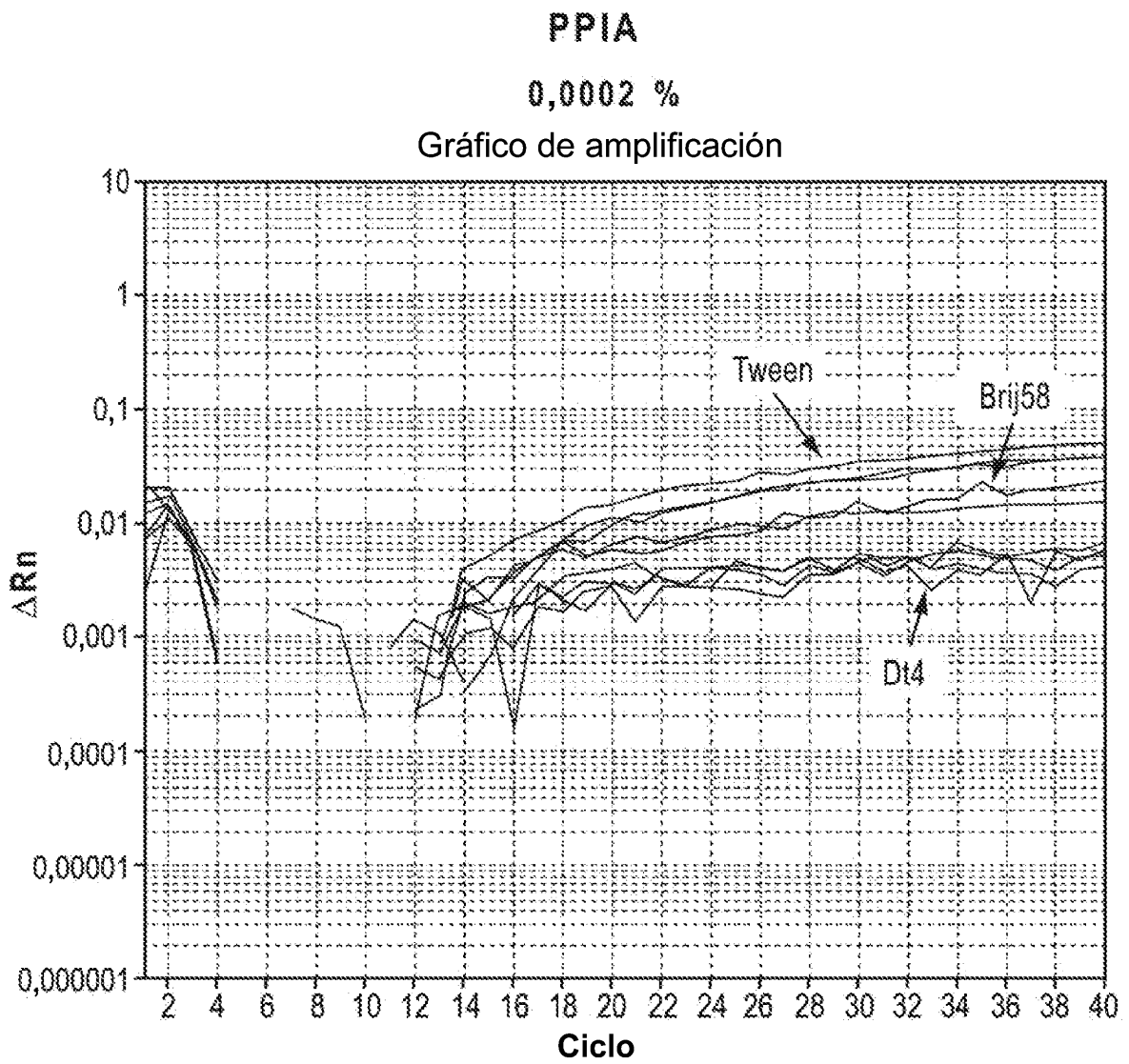


Figura 15-1

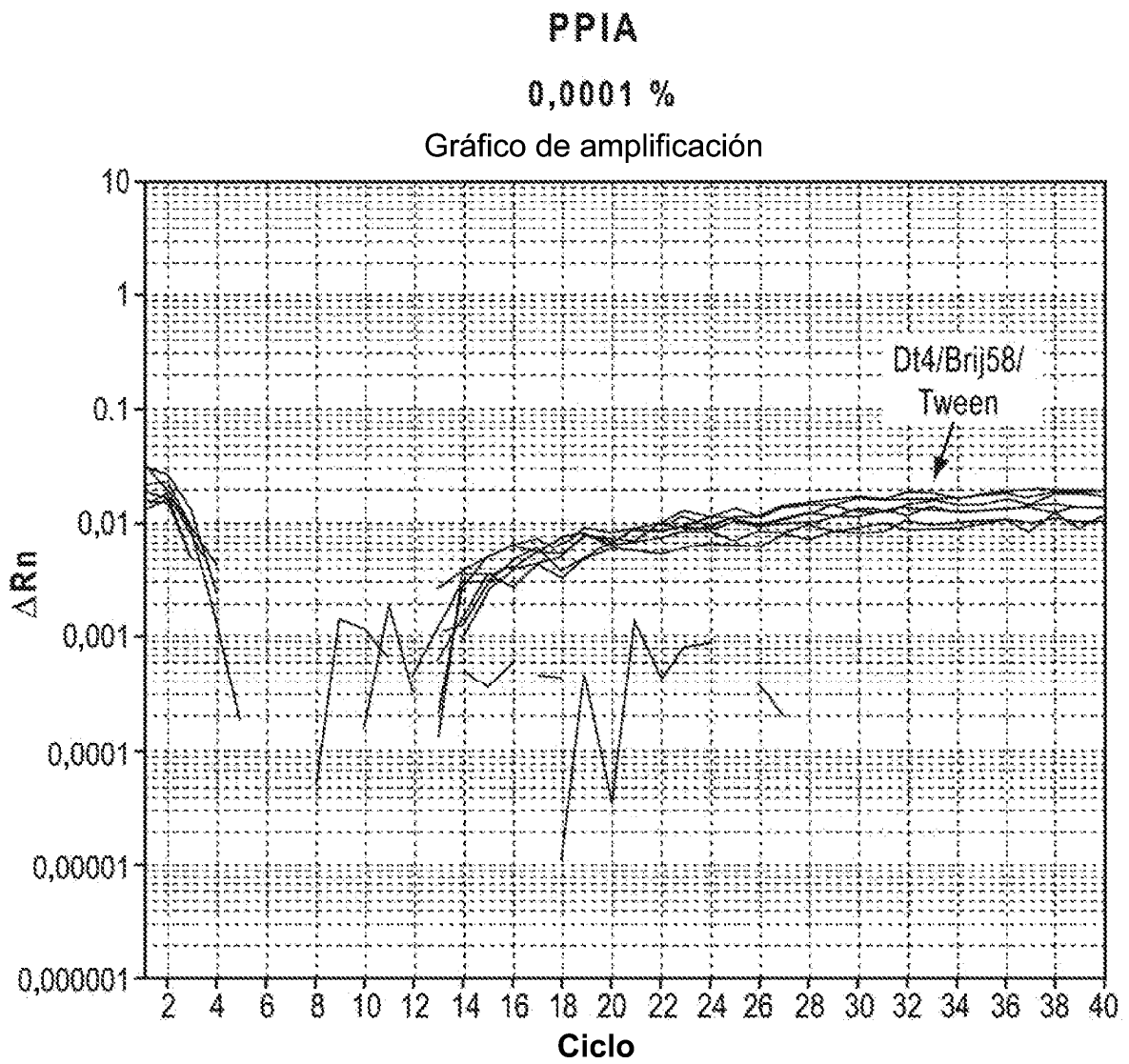


Figura 15-2

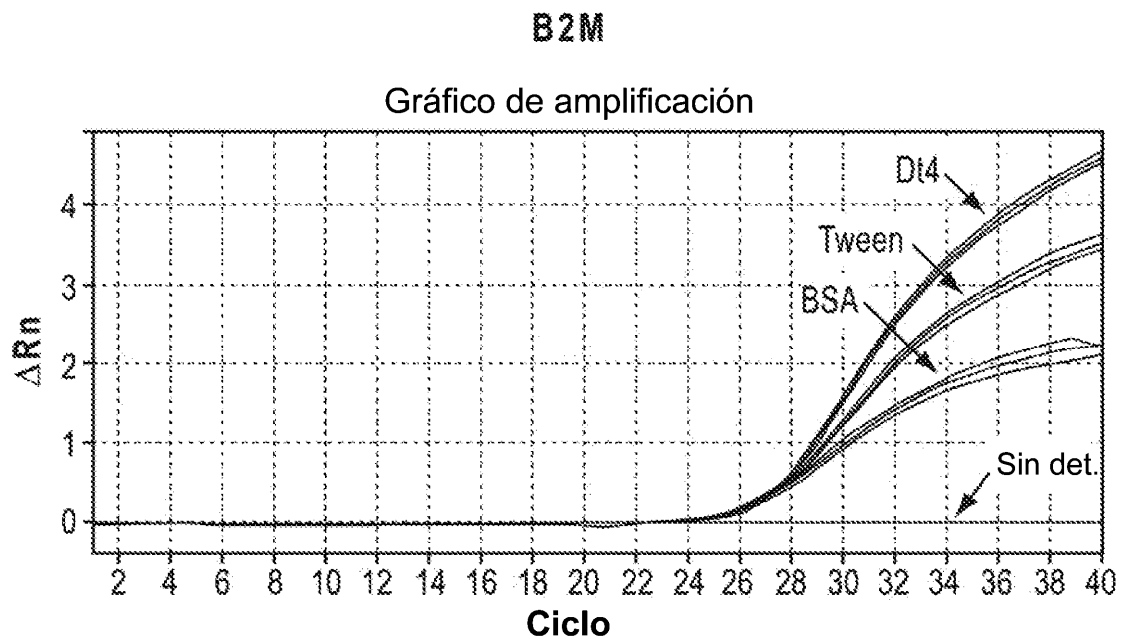


Figura 16

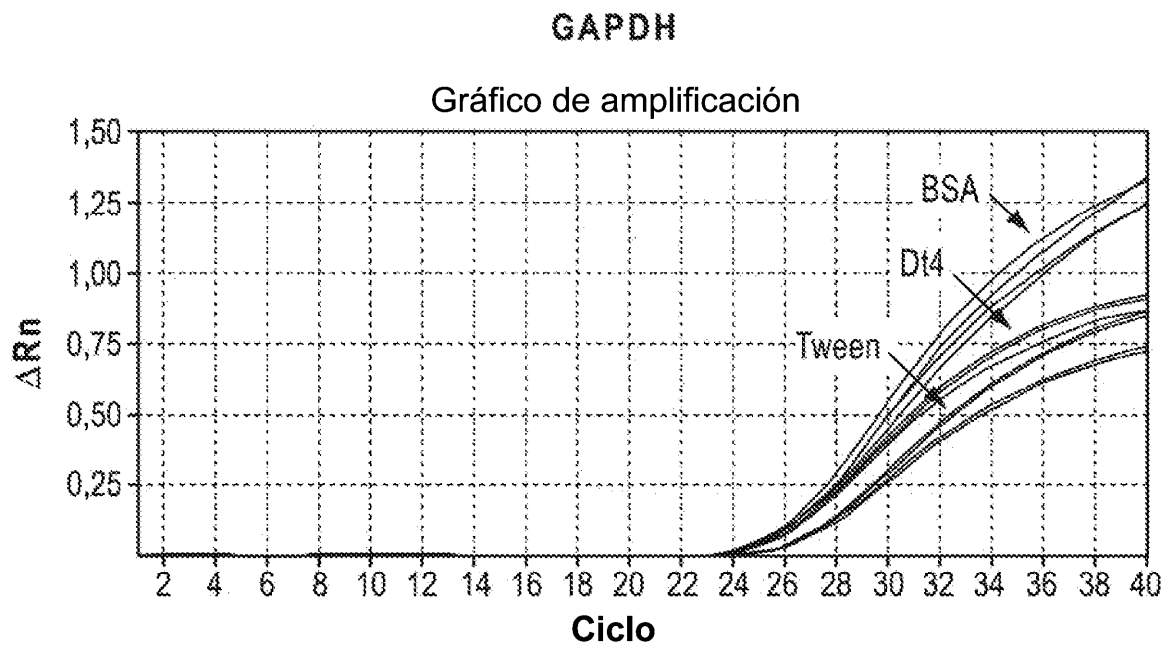


Figura 17

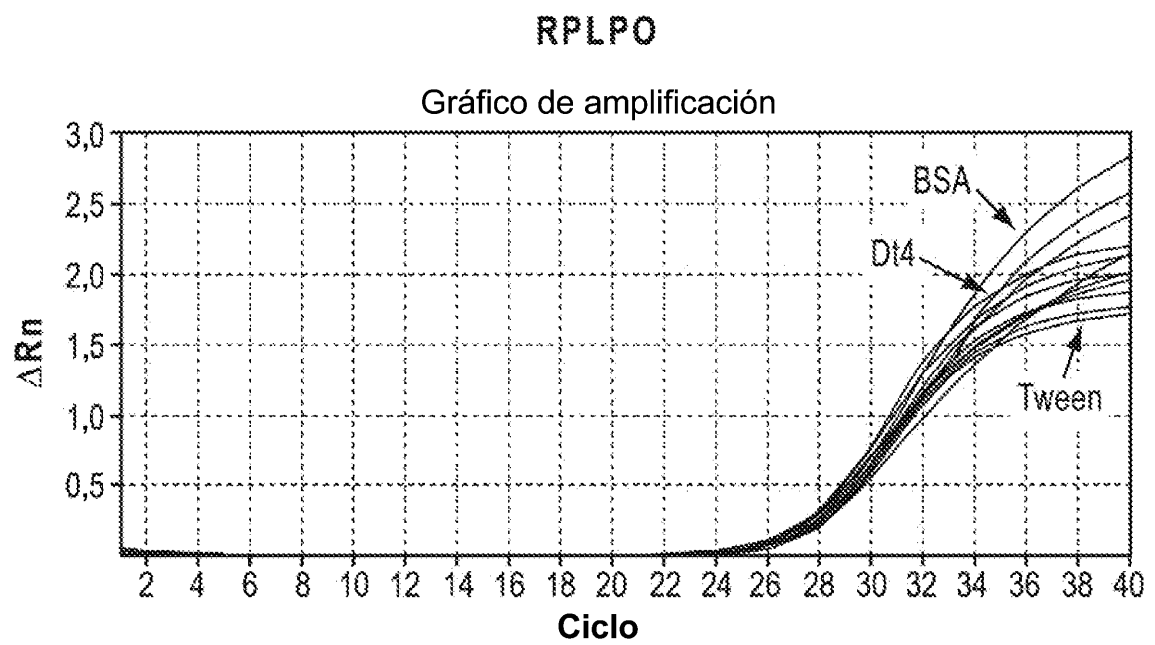
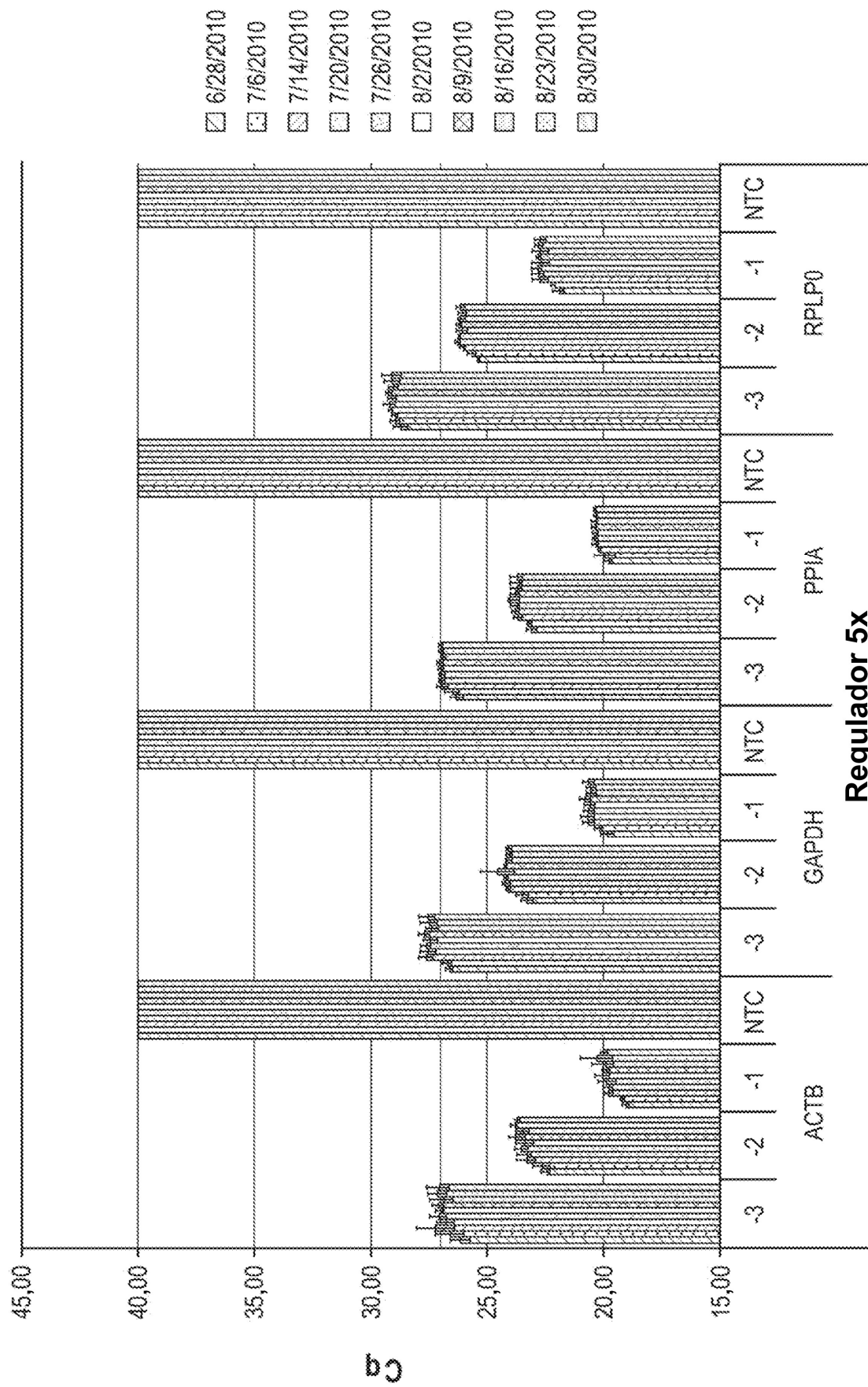
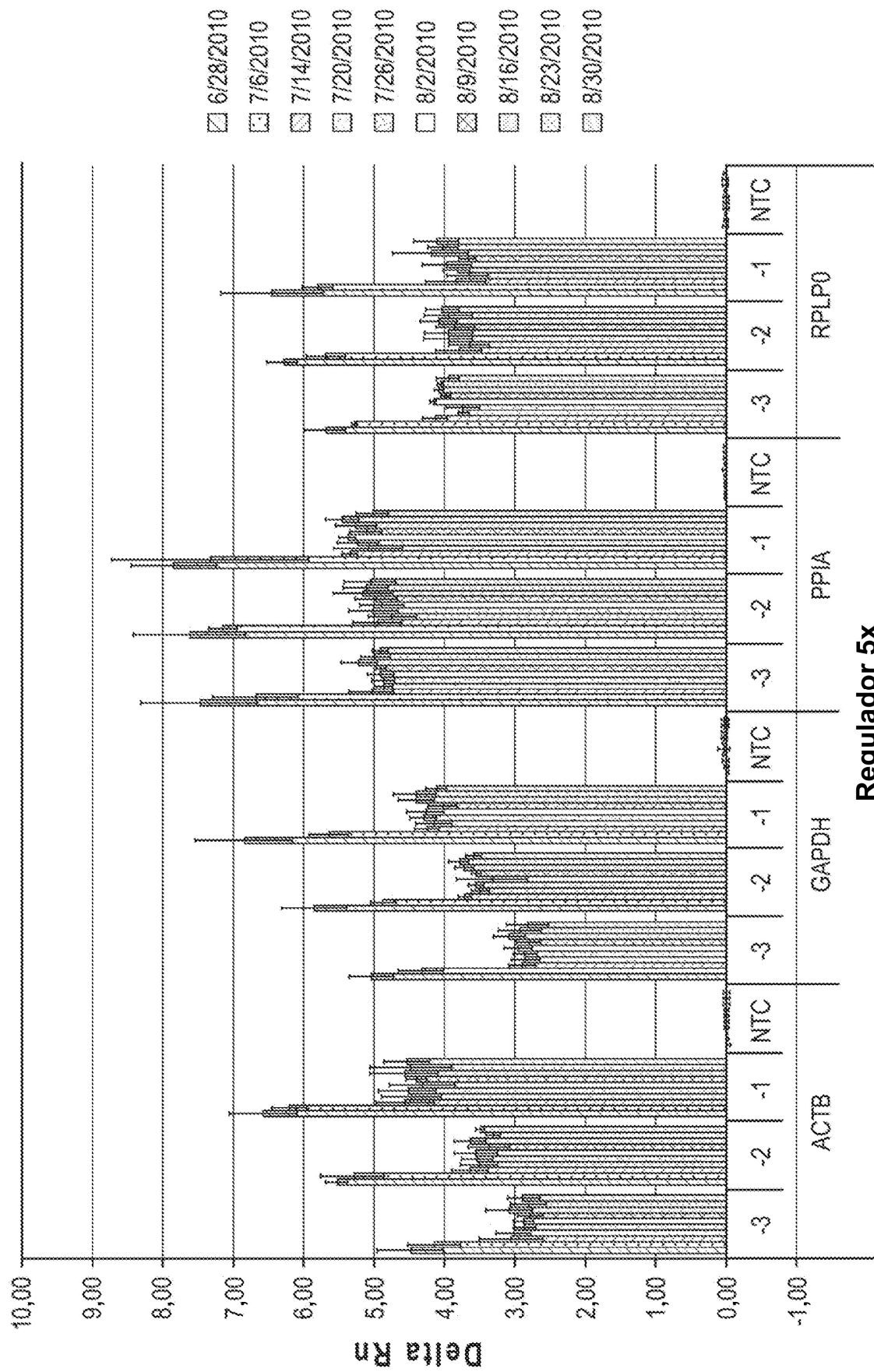


Figura 18





Regulador 5x

Figura 20

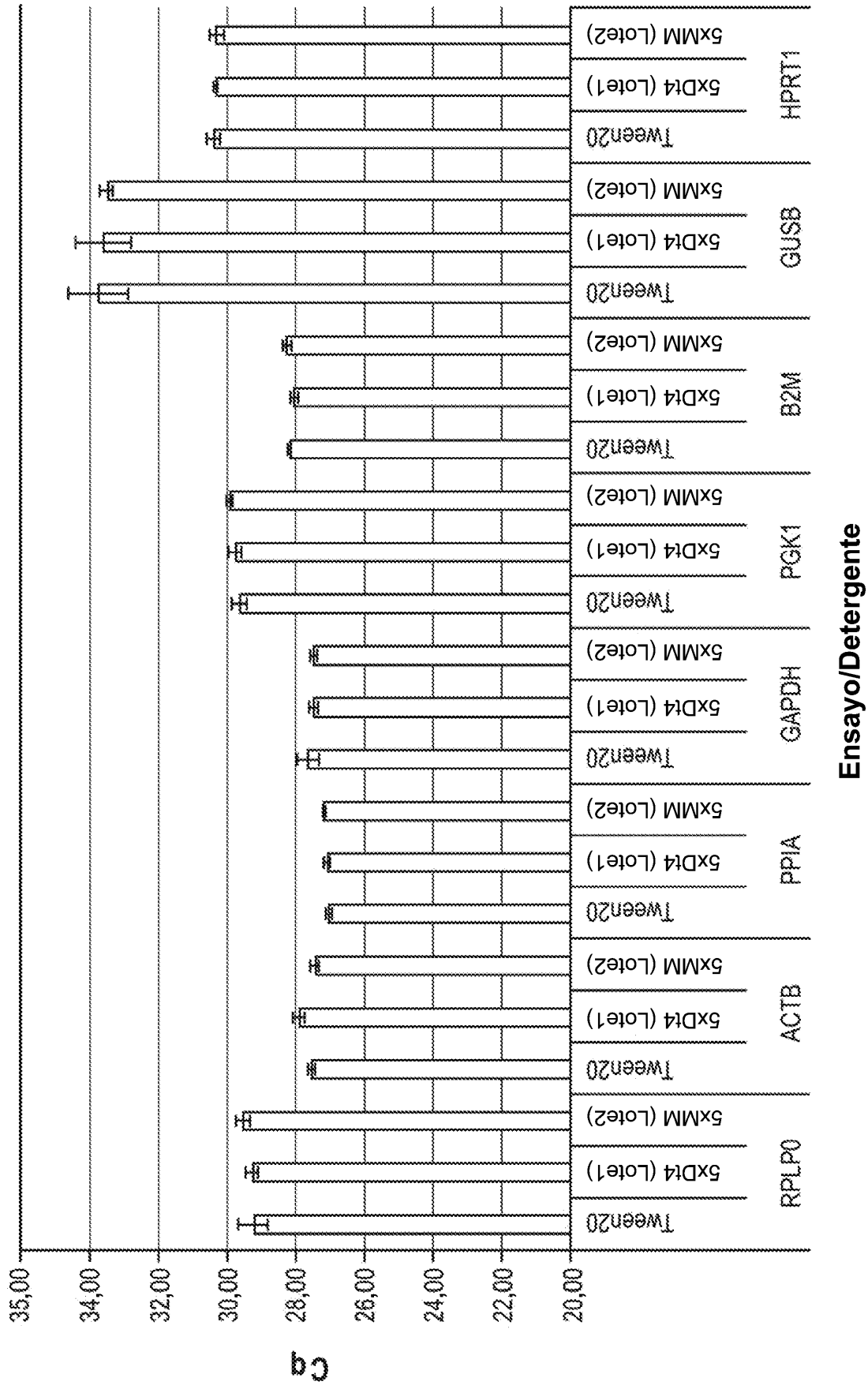
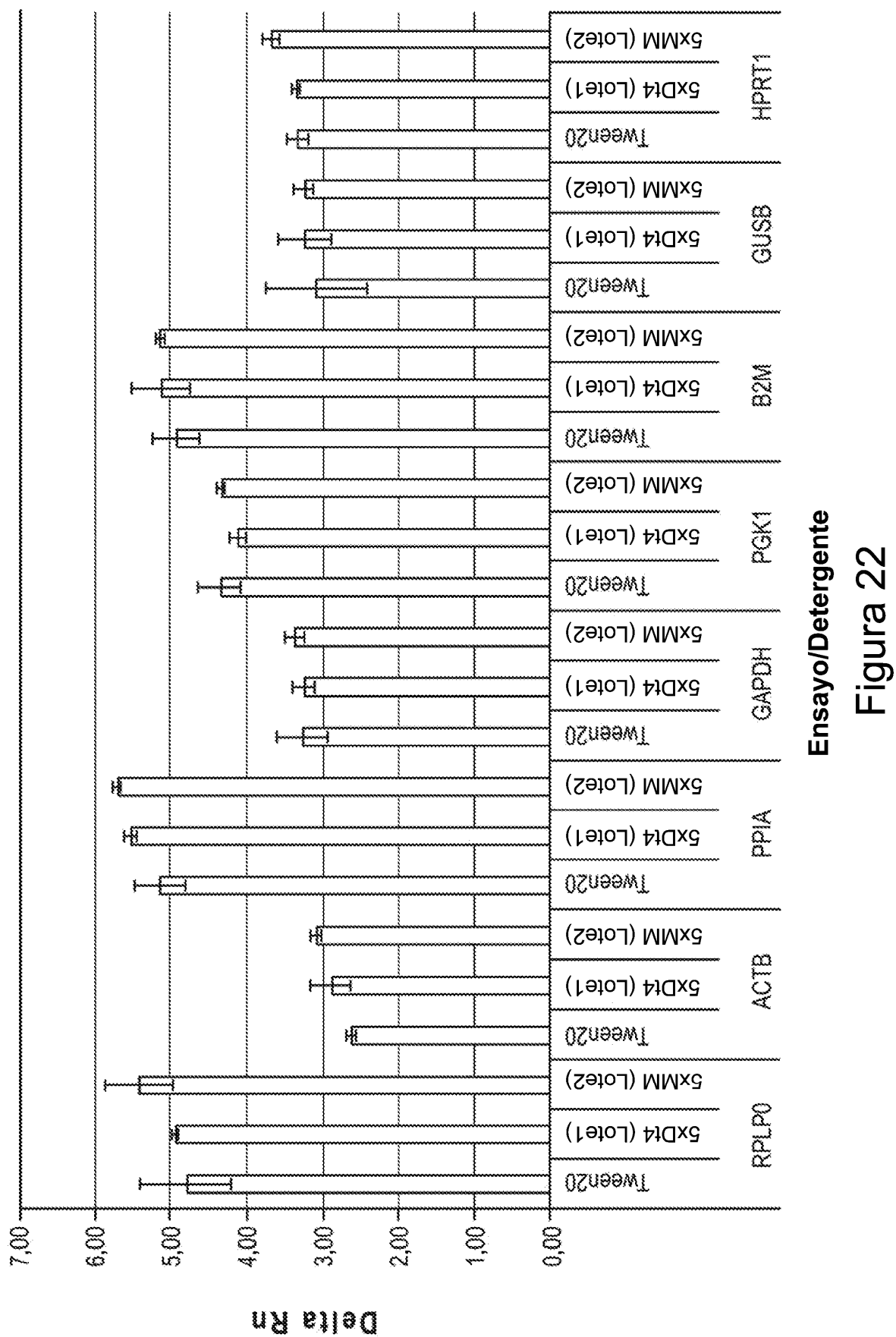


Figura 21



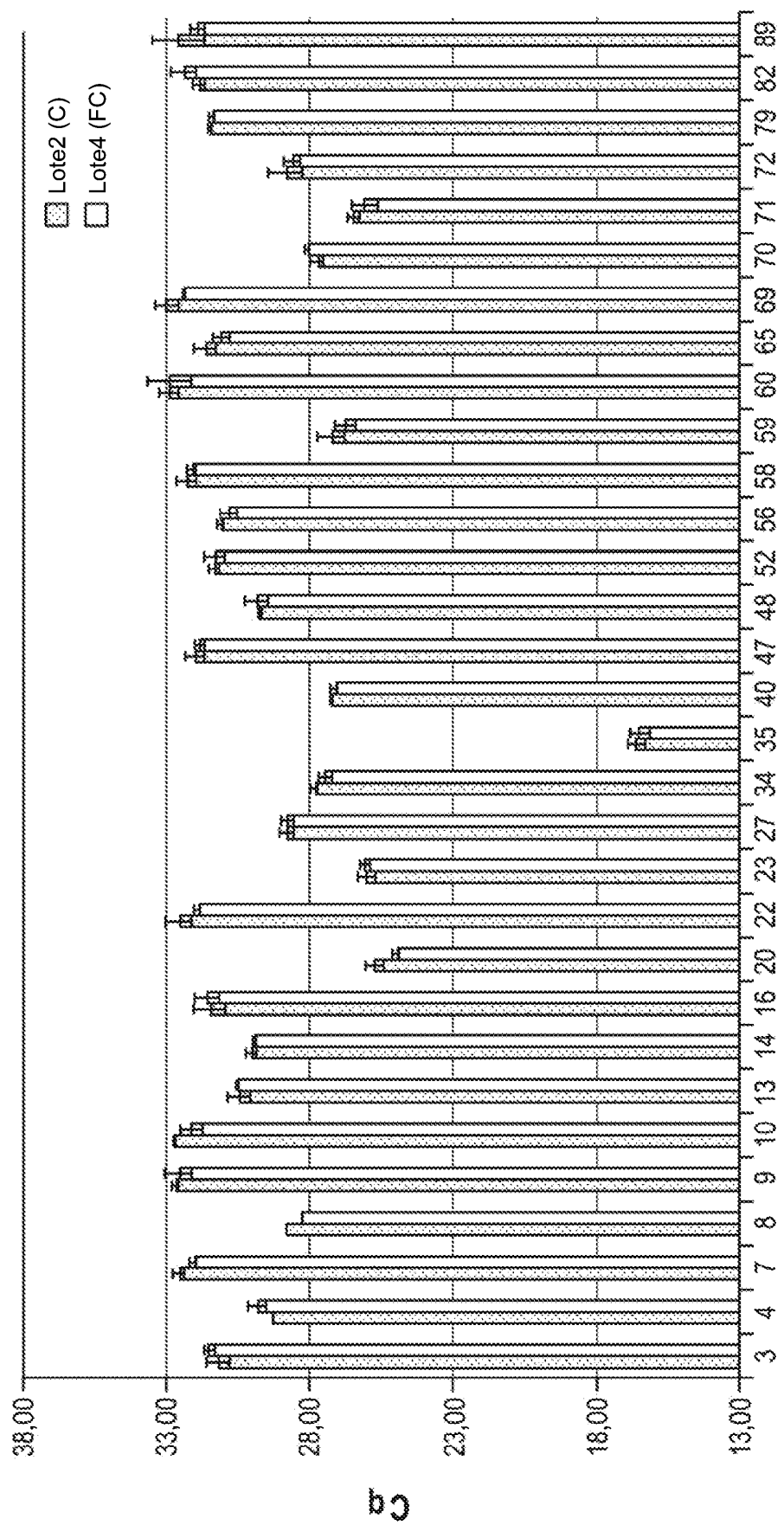


Figura 23