



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 983**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 5/113 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07703556 .6**
96 Fecha de presentación : **23.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1989324**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Reacción en cadena de polimerasa con arranque en caliente por secuestro de magnesio.**

30 Prioridad: **27.02.2006 EP 06003903**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Ankenbauer, Waltraud;**
Heindl, Dieter y
Laue, Frank

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 364 983 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

Reacción de cadena de polimerasa con arranque en caliente por secuestro de magnesio

5

Sector técnico

La presente invención se refiere al sector técnico de la amplificación de ácidos nucleicos llevando a cabo el proceso de reacción de la cadena de polimerasa (PCR). De manera más precisa, la presente invención da a conocer una nueva alternativa de arranque en caliente "hot start" para llevar a cabo PCR, que permite eventos de cebado no específicos y la generación de falsos productos de amplificación.

10

Técnica anterior

Un problema importante con la amplificación de ácido nucleico y de manera más específica con la reacción PCR es la generación de productos de amplificación no específicos. En muchos casos esto es debido al cebado no específico de oligonucleotidos y a un evento de extensión del cebador antes del propio proceso de termociclado real, dado que las polimerasas de ADN termoestables son también moderadamente activas a temperatura ambiente. Por ejemplo, se observan frecuentemente productos de amplificación debidos a dimerización y subsiguiente extensión que ha tenido lugar eventualmente al azar. A efectos de superar este problema es bien conocido en la técnica llevar a cabo una PCR llamada "arranque en caliente" ("hot start"), en la que se separa de la mezcla de reacción o se mantiene en estado inactivo un componente esencial para la reacción de amplificación hasta que la temperatura de la mezcla de reacción aumenta por primera vez. Dado que la polimerasa no puede funcionar en estas condiciones, no hay alargamiento del cebador durante este periodo cuando los cebadores no se pueden unir específicamente. Para conseguir este efecto se han aplicado varios métodos:

15

20

25

a) Separación física de ADN polimerasa

La separación física puede ser obtenida, por ejemplo, por una barrera de cera sólida, que separa el compartimiento que contiene el ADN polimerasa con respecto al compartimiento que contiene el volumen de los otros reactivos. Durante la primera etapa de calentamiento la cera se funde automáticamente y los compartimientos fluidos se mezclan (Chou, Q. y otros Nucleic Acids Res 20 (1992) 1717-23, US 5.411.876). De manera alternativa, el ADN polimerasa es inmovilizada por afinidad sobre un soporte sólido antes de la reacción de amplificación y se libera solamente a la mezcla de reacción por una liberación mediada por calor (Nilsson, J. y otros Biotechniques 22 (1997) 744-51). No obstante, ambos métodos son engorrosos en cuanto a tiempo y difíciles de realizar.

30

35

b) Modificación química de ADN polimerasa

Para este tipo de PCR de arranque en caliente el ADN polimerasa es inactivada de manera reversible como resultado de una modificación química. De manera más precisa, se introducen grupos de bloqueo lábiles al calor en la Taq (US 5.773.258) ADN polimerasa que hace la enzima inactiva a temperatura ambiente. Estos grupos de bloqueo son eliminados a alta temperatura durante una etapa pre-PCR de manera tal que la enzima resulta activada. Esta modificación lábil al calor puede ser obtenida, por ejemplo, por acoplamiento de anhídrido citracónico o anhídrido aconítrico a los residuos de lisina de la enzima. Las enzimas que llevan a cabo estas modificaciones se encuentran a disposición comercialmente con las designaciones Amplitaq Gold (Moretti, T. y otros Biotechniques 25 (1998) 716-22) o FastStart ADN polimerasa (Roche Molecular Bichemicals). No obstante, la introducción de grupos bloqueantes es una reacción química que tiene lugar arbitrariamente en todos los residuos estéricamente disponibles de lisina de la enzima. Por lo tanto, la reproductibilidad y la calidad de los preparados de enzimas, modificadas químicamente, pueden variar y difícilmente se pueden controlar.

40

45

50

c) Modificación recombinante de ADN polimerasa

Se han preparado por medio de ingeniería genética mutantes sensibles al frío de Taq polimerasa. Estos mutantes difieren de la enzima natural por el hecho de que carecen del terminal N (US 6.241.557). En contraste con Taq polimerasa recombinante de tipo nativo o salvaje, estos mutantes son completamente inactivos por debajo de 35° C, y, por lo tanto, pueden ser utilizados en algunos casos para llevar a cabo una PCR de arranque en caliente. No obstante, el mutante sensible al frío con terminal N truncado requiere condiciones de tampón de bajo contenido salino, tiene una capacidad de proceso más baja en comparación con la enzima de tipo salvaje, y por lo tanto puede ser utilizado solamente para la amplificación de ácidos nucleicos objetivo cortos. Además, dado que la forma truncada carece de actividad 5'-3' exonucleasa, no puede ser utilizada para experimentos de PCR en tiempo real, basados en el formato de detección TacMan.

55

60

d) Inhibición de ADN polimerasa por aditivos de ácido nucleico

Se ha demostrado que la extensión de cebadores no específicamente equilibrados es inhibida por la adición de

65

fragmentos cortos de ADN de doble hebra (Kainz, P. y otros *Biotechniques* 28 (2000) 278-82). En este caso, la extensión del cebador es inhibida a temperaturas por debajo del punto de fusión del fragmento de ADN de doble hebra corto, pero de manera independiente de la secuencia del propio ADN competidos. No obstante, no es conocido hasta que medida el exceso de ADN competidor influye en el rendimiento de la reacción de amplificación del ácido nucleico.

De manera alternativa, se pueden utilizar Aptameros oligonucleotidos con una secuencia específica que resultan en una estructura secundaria definida. Estos aptameros han sido seleccionados utilizando tecnología SELEX para conseguir una afinidad muy elevada con respecto a el ADN polimerasa (5.693.502, Lin, Y. Jayasema, S. D. *Mol Biol* 271 (1997) 100-11). La presencia de dichos aptameros dentro de la estructura de amplificación antes del propio proceso de termociclado real tiene como resultado también una unión de alta afinidad a el ADN polimerasa, y, como consecuencia, una inhibición lábil térmicamente de su actividad (US 6.020.130). No obstante, debido al proceso de selección, todos los aptameros disponibles hasta el momento pueden ser utilizados solamente en combinación con una especie particular de ADN polimerasa.

e) Anticuerpos Taq ADN

En un enfoque alternativo para conseguir la inhibición térmicamente lábil de Taq ADN polimerasa es la adición de anticuerpos monoclonales criados contra la enzima purificada (Kellogg, D. E. y otros *Biotechniques* 16 (1994) 1134-7; Sharkey, D. J. y otros *Biotechnology (N Y)* 12 (1994) 506-9). Igual que los aptameros oligonucleotidos, el anticuerpo se une a Taq ADN polimerasa con elevada afinidad a temperatura ambiente de manera inhibitoria (US 5.338.671). El complejo es resuelto en una etapa de precalentamiento antes del propio procedimiento de termociclado. Esto conduce a una sustancial prolongación del tiempo necesario para la amplificación en su conjunto, especialmente si se aplican protocolos para termociclado rápido (WO 97/46706).

El documento US 5.985.619 da a conocer una realización específica para llevar a cabo PCR utilizando un anticuerpo de arranque en caliente, en el que además de Taq polimerasa se añade, por ejemplo, exonucleasa III procedente de *E. coli* como suplemento a la mezcla de amplificación a efectos de digerir intermedios dímeros cebadores no específicos. Tal como se ha dado a conocer en lo anterior, la exonucleasa III reconoce ADN de doble hebra como sustrato igual que, por ejemplo, productos híbridos de extensión diana/cebador- o diana/cebador. La digestión tiene lugar por medio de fraccionamiento del enlace de fosfodiéster en el extremo 5' del residuo de desoxinucleotido del terminal 3'. Dado que este tipo de exonucleasa es activa a temperaturas ambiente, todos los cebadores no específicamente asociados y productos de extensión de cebadores son, por lo tanto, digeridos. Esto tiene como resultado en algunas realizaciones una especificidad, incluso incrementada, de la reacción de amplificación. No obstante, la digestión de los cebadores no especificados, dependientes de la duración del tiempo de preincubación, puede conducir a una disminución sustancial e incontrolada de la concentración del cebador, que a su vez puede afectar la propia reacción de amplificación.

f) Utilización de cebadores modificados solos o en combinación con exonucleasas

Los documentos EP 0 799 888 y GB 2293238 dan a conocer una adición de oligonucleotidos bloqueados en 3' a reacciones PCR. Debido al bloqueo 3', estos oligonucleotidos no pueden actuar como cebadores. Los oligonucleotidos bloqueados están diseñados para competir/interaccionar con cebadores PCR, lo que resulta en la reducción de productos no específicos.

Otra alternativa es la utilización de cebadores oligonucleotidos fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de reacción PCR (EP 0 744 470). En este caso una 3' exonucleasa, que usualmente acepta sustratos de ADN de doble hebra y también de hebra simple, degrada elementos dúplex, tales como dímeros cebador y amplicones de arrastre, dejando los cebadores de amplificación de hebra simple sin degradar. De manera similar, la utilización de cebadores con un extremo 3' modificado básico y la eliminación dependiente de molde por *E. coli* Endonucleasa IV, ha sido sugerida en el documento (US 5.792.607).

Una realización específica de la idea general se encuentra en el documento EP 1 275 735. Su descripción da a conocer una composición para llevar a cabo una reacción de amplificación del ácido nucleico, que comprende (i) un ADN polimerasa termoestable, (ii) una 3'-5' exonucleasa termoestable, y (iii), como mínimo, un cebador para amplificación de ácido nucleico con un residuo modificado en terminal 3' que no es alargado por dicha ADN polimerasa termoestable y también métodos para llevar a cabo una reacción PCR utilizando esta composición. Además, el método está dirigido a kits que comprenden esta composición.

No obstante, es un inconveniente importante de las alternativas que se dan a conocer, que para reacción PCR se requieren cebadores modificados, lo cual conduce a mayores exigencias con respecto al incremento de costes para cada ensayo individual.

g) Otros aditivos para PCR

Otros aditivos orgánicos, conocidos en la técnica, tales como DMSO, betainas, y formamidas (WO 99/46400; Hengen, P. N Trends Biochem Sci 22 (1997) 225-6; Charkrabarti, R. y Schutt, C. E. y Nucleic Acids Res 29 (2001) 2377-81) tienen como resultado una mejora de la amplificación de secuencias ricas en GC, en vez de la prevención de formación de dímeros cebadores. De manera similar, la heparina puede estimular la transcripción corriente in vitro, presumiblemente al eliminar proteínas, tales como histonas a efectos de hacer accesible el ADN cromosomal (Hilderbrand, C. E. y otros Biochimica et Biophysica Acta 477 (1977) 295-311).

También se sabe que la adición de proteínas de unión de hebra única (US 5.449.603) o tARN, (Sturzenbaum, S. R. Biotechniques 27 (1999) 50-2) tiene como resultado una asociación no covalente de estos aditivos a los cebadores. Esta asociación es interrumpida cuando se efectúa el calentamiento durante PCR. También se ha descubierto que la adición de helicasas de ADN impide la reasociación al azar de los cebadores (Kaboev, O. K. y otros Bioorg Khim 25 (1999) 398-400). Además, se puede utilizar poliglutamato (WO 00/68411) en varios casos para inhibir la actividad de la polimerasa a bajas temperaturas.

Además, es sabido que los inhibidores de polimerasa polianionicos pueden controlar la actividad de ADN polimerasas termoestables, dependiendo de la temperatura de incubación aplicada. El documento US 6.667.165 da a conocer una realización de arranque en caliente, caracterizada porque los complejos polimerasa-inhibidor se forman a temperaturas por debajo de 40° C. Entre 40° C y 55° C el inhibidor compite con el ADN de molde para unión con Taq polimerasa, mientras que a temperaturas por encima de 55° C el inhibidor es desplazado del lugar activo de la polimerasa. No obstante, el inhibidor tiene a reducir el rendimiento de productos obtenibles cuando se utilizan cebadores con temperaturas de reasociación bajas.

h) Secuestro de magnesio

Dado que he sabido desde hace mucho tiempo que las polimerasas termoestables son activas solamente en presencia de cationes Mg²⁺, se ha intentado un secuestro de magnesio antes del inicio del protocolo de termociclado a efectos de evitar errores de cebado y extensión no específica del cebador. Tal como se da a conocer en el documento US 6.403.341, los Mg²⁺ pueden encontrarse presentes en forma de precipitado, y por lo tanto, no disponibles en el inicio de la reacción de amplificación. Cuando tiene lugar un incremento de la temperatura durante la primera parte del termociclado, el precipitado se disuelve y los Mg²⁺ pasan a encontrarse completamente disponibles dentro de los primeros tres ciclos. Esta solución se ha demostrado que es aplicable y capaz de proporcionar buenos resultados en un arranque en caliente. Por otra parte, esta solución no permite la preparación de mezclas maestras que contienen todos los reactivos, excepto el cebador y el ácido nucleico objetivo, que son necesarias para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico. Como consecuencia, la reproducibilidad de datos de ensayos intermedios y comparaciones de datos resultan complicadas.

Teniendo en cuenta la técnica anterior que se ha explicado, ha sido un objetivo de la invención el dar a conocer una composición y método alternativo mejorado para arranque en caliente de PCR, que permite la inhibición de cebado no específico y extensión del cebador, no solamente antes del proceso de amplificación en sí mismo, sino también durante el proceso de termociclado. De manera precisa, ha sido un objeto de la invención dar a conocer una composición y métodos alternativos para arranque en caliente, en el que no puede tener lugar la extensión de cebadores no específicamente reasociados.

Breve descripción de la invención

La mayor parte de polimerasas termoestables, capaces de catalizar una reacción de cadena de polimerasa, dependen de la presencia de un catión bivalente, usualmente Mg²⁺. La presente invención se basa en el principio de generar un efecto de arranque en caliente añadiendo un compuesto unión de catión bivalente a una mezcla de reacción de cadena de polimerasa, que une cationes bivalentes de forma dependiente de la temperatura.

De este modo, se da a conocer un péptido sintético en los ejemplos, que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de un catión bivalente.

Dicho péptido sintético se une a dicho catión bivalente con una constante de afinidad entre 0,01 mM y 10000µM.

Dado que la mayor parte de polimerasas termoestables son dependientes de Mg²⁺, dicho lugar de unión del catión bivalente es un motivo que une Mg²⁺.

En una realización específica, el péptido sintético comprende el motivo de secuencia de aminoácido X1X2X3, por lo menos una vez, de manera que

X1 es un aminoácido cargado negativamente, preferentemente ácido aspártico

X2 es Glicina o un aminoácido alifático

X3 es un aminoácido cargado negativamente

En un primer aspecto, la presente invención está dirigida a un péptido sintético, seleccionado entre el grupo que consiste en

- 5
 H-DIET-NH2
 H-DIETDIET-NH2
 H-DIETDIETDIET-NH2
 y H-FDGDFDGD-NH2

10 En un segundo aspecto, la presente invención está dirigida a una composición que comprende

- un ADN polimerasa termoestable

15 - como mínimo un tipo de catión bivalente, preferentemente Mg²⁺

- desoxinucleotidos

20 - un tampón

- un péptido sintético que tiene un longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de un catión bivalente, tal como se ha indicado en lo anterior.

25 De manera preferente, dicha composición, según la presente invención, comprende además, como mínimo, un compuesto de ácido nucleico, tal como un cebador y/o un ácido nucleico objetivo que se amplificará.

En un tercer aspecto, la presente invención está dirigida a un kit que comprende

30 - un péptido, tal como se ha indicado en lo anterior, y

- un ADN polimerasa termoestable

35 En un cuarto aspecto, la presente invención está dirigida a un método para amplificación de un ácido nucleico diana específico, que comprende las siguientes etapas:

- disponer una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana

- añadir una composición, tal como se ha indicado anteriormente, y

40 - llevar a cabo una reacción de cadena de polimerasa

En una realización específica, dicha reacción de cadena de polimerasa es controlada en tiempo real.

45 En una realización específica adicional, el producto de amplificación generado por dicha amplificación, es sometido a un análisis de curva de fusión.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

50 La figura 1 muestra el efecto del péptido de unión de magnesio con la secuencia DIETDIET, tal como se da a conocer en el ejemplo 1. La formación de producto dímero cebador (⇒) se suprime cuando el péptido se encuentra presente en la mezcla de reacción PCR sin influencia en la formación de producto específico (→).

55 Vías 1: marcador de peso molecular VI de Roche Applied Science

2, 7: 50 ng de ADN molde

3, 8: 25 ng de ADN molde

60 4, 9: 10 ng de ADN molde

5, 10: 5 ng de ADN molde

65 6, 11: 1 ng de ADN molde

Los productos de las vías 2 a 6 se amplificaron en ausencia de péptido, los productos de las vías 7 a 11 en presencia de 2 mM del péptido con la secuencia H-DIETDIET-NH₂.

- 5 La formación de producto dímero cebador (\Rightarrow) se suprime cuando el péptido se encuentra presente en la mezcla de reacción PCR sin influencia en la formación de producto específico (\rightarrow).

Figura 2

- 10 La figura 2 muestra el efecto de péptido de unión de magnesio de la secuencia H-FDGDFDGD-NH₂. La formación de producto dímero cebador (\Rightarrow) se reduce cuando el péptido se encuentra presente en la reacción PCR, se observa en paralelo un incremento de la formación de producto específico (\rightarrow). Vía 1: marcador de peso molecular VI de Roche Applied Science

- 15 2:25 ng de ADN molde, sin péptido
 3:25 ng de ADN molde, 3 mM péptido
 4:10 ng de ADN molde, sin péptido
 20 5:10 ng de ADN molde, 3 mM péptido

Figura 3

- 25 Figura 3A: RT-PCR con 102 a 106 copias de G6PDG RNA en ausencia de péptido de unión de magnesio.
 Figura 3b: análisis de la curva de fusión de RT-PCR con 102 a 106 copias de G6PDG RNA en ausencia de péptido de unión de magnesio.
 30 Figura 3c: RT-PCR con 102 a 106 copias de G6PDG RNA en presencia de 1 mM de péptido de unión de magnesio.
 Figura 3d: análisis de curva de fusión de RT-PCR con 102 a 106 copias de G6PDG RNA en presencia de un mM de péptido de unión de magnesio.

Figura 4

- Los productos de las vías 2 a 6 fueron amplificados en ausencia del péptido H-DIETDIETDIET-NH₂, los productos de las vías 7 a 11 en presencia de 2,0 mM del péptido con la secuencia H-DIETDIETDIET-NH₂. La formación de producto dímero cebador (\Rightarrow) se suprime cuando el péptido se encuentra presente en la mezcla de reacción de PCR sin influencia sobre la formación de producto específico (\rightarrow).

Vías 1-12: marcador de peso molecular V de Roche Applied Science

- 45 2, 7: 50 ng de ADN molde
 3, 8: 25 ng de ADN molde
 4, 9: 10 ng de ADN molde
 50 5, 10: 5 ng de ADN molde
 6, 11: 1 ng de ADN molde

Descripción detallada de la presente invención

- 55 La mayor parte de polimerasas termoestables capaces de catalizar una reacción de cadena de polimerasa dependen de la presencia de un catión bivalente, usualmente Mg²⁺. La presente invención se basa en el principio de generar un efecto de arranque en caliente, añadiendo un compuesto de unión de catión bivalente a una mezcla de reacción de cadena polimerasa, que une cationes bivalentes en forma dependiente de la temperatura.

- 60 De este modo, en un tercer aspecto, la presente invención está dirigida a métodos de amplificación, composiciones y kits que utilizan un péptido sintético, que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de 1 catión bivalente. Los péptidos sintéticos más pequeños, que tienen una longitud de 17 aminoácidos, han sido también utilizados. Dado que un lugar de unión para cationes bivalentes requiere, como mínimo, 3-4
 65 residuos de aminoácidos (ver a continuación), el límite inferior de dimensión es un péptido que consiste en 3-4

aminoácidos, que representan un monómero de un lugar de unión de catión bivalente. También se encuentra dentro del ámbito de la presente invención si dichos péptidos sintéticos contienen más de un motivo de lugar de unión de catión bivalente, es decir, si contienen dichos motivos dos veces, tres veces, o cuatro veces. No obstante, dichos péptidos sintéticos, según la presente invención, además de aminoácidos que representan un motivo de secuencia de unión de catión bivalente pueden contener otros aminoácidos que no forman parte de dicho motivo, pero pueden contribuir a otras características de dicho péptido. Por ejemplo, los residuos adicionales de aminoácidos pueden incrementar la solubilidad de dichos péptidos en diferentes disolventes.

En el contexto de la presente invención, el término "péptido sintético" se define como una cadena de aminoácidos conectada por enlaces amida, que ha sido sintetizada químicamente por medio de condensación. No obstante, se excluyen de manera explícita los péptidos, o fragmentos de péptidos que han sido obtenidos a partir de organismos vivos, por medio de aislamiento y fragmentación (opcional).

Estos péptidos sintéticos pueden ser utilizados de acuerdo con los métodos que son bien conocidos en esta técnica. La síntesis se basa en una reacción de ciclado automatizado, en el que los aminoácidos son conectados a la cadena de péptido naciente en una reacción de condensación por medio de la formación de un enlace amida. Las cadenas laterales reactivas de los aminoácidos acoplados son cubiertas por grupos protectores apropiadamente eliminables. Un resumen general del estado de la técnica es el facilitado por Fields, G. B, Noble, R. L, J. Peptide Protein Res. 35 (1990) 161-214. Estos resultados de síntesis química en la generación de péptidos que tienen un terminal típico H_2N (referenciado habitualmente como "H") y un terminal C- con un carboxi-amidato (usualmente indicado como " N_2H ").

Los péptidos, según la presente invención, son capaces de unirse a cationes bivalentes. La fuerza de la unión depende predominantemente de la naturaleza del catión bivalente, conjuntamente con el motivo de la secuencia de péptido primario del péptido. Preferentemente, dicho péptido sintético, de acuerdo con la presente invención, se une con dicho catión bivalente con una constante de afinidad entre 0,01 mM y 10000 μ M a pH neutro. Los compuestos con tasas de afinidad más fuertes, tales como EDTA, se ha demostrado que resultan en efectos desfavorables cuando se añaden a una reacción de amplificación mientras que, por otra parte, se requiere una tasa de afinidad mínima a efectos de generar un efecto positivo medible cuando dicho compuesto péptido es añadido a una reacción de amplificación de ácido nucleico. De manera más preferente, dicha constante de afinidad tiene un valor comprendido entre 0,01 mM y 1000mM. Más preferentemente, dicha constante de afinidad tiene un valor comprendido entre 1mM y 100mM.

Dado que la mayor parte de polimerasas termoestables dependen de Mg^{2+} , dicho lugar de unión del catión bivalente es, preferentemente, un motivo que se une a Mg^{2+} .

En la sección siguiente se aplica la siguiente clasificación de aminoácidos.

Sin subclase:

Glicina (Gly) G
Prolina (Pro) P

No polar, alifáticos:

Alamina (Ala), A
Valina (Val), V
Leucina (Leu), L
Isoleucina (Ile), I

Aromáticos:

Felilalanina (Phe), F
Tirosina (Tyr), Y
Tryptofina (Trp), W

Polar, sin carga:

Serina (Ser), S
Treonina (Thr), T
Cisteína (Cys), C
Metionina (Met), M
Asparagina (Asn), N
Glutamina (Gln), O

Con carga positiva:

Lisina (Lys), K
Arginina (Ag), R
Histidina (His), H

5 Con carga negativa:

Ácido aspártico (Asp), D
Ácido glutámico (Glu), E

10 Preferentemente, el péptido sintético comprende el motivo de secuencia de aminoácido X1X2X3, por lo menos una vez, de manera que X1 es un aminoácido cargado negativamente, preferentemente ácido aspártico.

15 X2 es Glicina o un aminoácido alifático.

X3 es un aminoácido cargado negativamente.

En una realización, X3 es un ácido glutámico.

20 Si este es el caso, X2 es, preferentemente, Isoleucina. Asimismo, preferentemente, en el terminal c adyacente a X3 existe un X4 que es un aminoácido sin carga, polar, tal como treonina.

Más preferentemente, X2 es Isoleucina y en el terminal c adyacente a X3 existe un X4 que es un aminoácido polar, sin carga, tal como treonina.

25 En otra realización X3 es un ácido aspártico.

Si este es el caso, X2 es preferentemente Glicina. También, preferentemente, en el terminal N adyacente a X1 existe un X0 que es un aminoácido aromático, tal como Fenilalanina.

30 Más preferentemente, X2 es Isoleucina y en el terminal N adyacente a X1 existe un X0 que es un aminoácido aromático, tal como Fenilalanina.

En un segundo aspecto, la presente invención está dirigida a una composición que comprende

- 35
- un ADN polimerasa termoestable
 - por lo menos un tipo de catión bivalente, preferentemente Mg²⁺
 - desoxinucleótidos
 - un tampón
 - 40 - un péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente, tal como se ha indicado en lo anterior.

Esta composición, según la presente invención, es utilizada para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico en forma de reacción de cadena de polimerasa PCR.

45 Como polimerasas termoestables, se puede utilizar una gran variedad de enzimas. Preferentemente, dicha ADN polimerasa termoestable es seleccionada de un grupo que consiste en *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfurococcus* sp. Tok., *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus* sp. (por ejemplo, *jannaschii*, *voltae*), *Methanothermus fervidus*., *Pyrococcus species* (*furiosus*, *species* GB- D, *woesii*, *abyssii*, *horikoshii*, KOD, Deep Vent, Proofstart), *Pyrodictium abyssii*, *Pyrodictium occultum*, *Sulfolobus* sp. (por ejemplo, *acidocaldarius*, *solfataricus*), *Thermococcus species* (*zilligii*, *barossii*, *furni-colans*, *gorgonarius*, JDF-3, *kodakaraensis* KOD1, *litoralis*, *species* 9 degrees North-7, *species* JDF-3, *gorgonarius*, TY), *Thermoplasma acidophilum*, *Thermosiphon africanus*, *Thermotoga* sp. (por ejemplo, *maritima*, *neapolitana*), *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Thermus species* (por ejemplo, *aquaticus*, *brockianus*, *filiformis*, *flavus*, *lacteus*, *rubens*, *ruber*, *thermophilus*, ZO5 or Dynazyme). También se encuentran dentro del alcance de la presente invención mutantes, variantes, o derivados de los mismos, quiméricos o "polimerasas de fusión", por ejemplo, Phusion (Finzymes o New England Biolabs, N° Catálogo F-530S) o iProof (Biorad, N° Catálogo 172-5300), Pfx Ultima (Invitrogen, N° Catálogo 12355012) o Herculase II Fusion (Stratagene, N° Catálogo 600675). Además, Herculase II Fusion (Stratagene, Catálogo N° 600675). Además, las composiciones, de acuerdo con la presente invención pueden comprender mezclas de una o varias de las polimerasas mencionadas.

En una realización, el ADN polimerasa termoestable es polimerasa dependiente de ADN. En otra realización, el ADN polimerasa termoestable tiene actividad de transcriptasa inversa adicional, y puede ser utilizada para RT-PCR. Un ejemplo de esta enzima es *Thermus Thermophilus* (Roche Diagnostics Catálogo N°: 11 480 014 001).

65 También se encuentran dentro del ámbito de la presente invención mezclas de una o varias polimerasas

compiladas en lo anterior con transcriptasas inversas retrovirales, por ejemplo, polimerasas procedentes de MMLV, AMV, AMLV, HIV, EIAV, RSV y mutantes de estas transcriptasas inversas.

5 El péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente, se encuentra presente en una concentración que permite un "efecto de arranque en caliente", una vez que la composición es utilizada para amplificar un ácido nucleico diana. Usualmente, el péptido que comprende el lugar de unión de Mg^{2+} puede encontrarse presente en una concentración final entre 0,1 y 10 mM. Preferentemente, el péptido que comprende el lugar de unión de Mg^{2+} se encuentra presente entre 0,5 y 5 mM. Son altamente preferentes concentraciones entre 1 y 3 mM.

10 Las concentraciones de ADN polimerasa, el desoxinucleótido y los otros componentes tampón se encuentran presentes en cantidades estándar, cuyas concentraciones son bien conocidas en la técnica. La concentración de Mg^{2+} puede variar entre 0,1 y 3 mM y está preferentemente adaptada y optimizada experimentalmente. No obstante, dado que el óptimo de la concentración depende usualmente de las secuencias de cebador reales utilizadas, no se puede efectuar una predicción teórica.

20 Además de las composiciones que se han dado a conocer en lo anterior, se encuentra también dentro del ámbito de la presente invención si estas composiciones comprenden además, como mínimo, un compuesto de ácido nucleico. Por ejemplo, una composición de este tipo puede comprender, como mínimo, un par de cebadores de amplificación, útiles para llevar a cabo reacciones de amplificación de ácido nucleico. Una composición de acuerdo con la presente invención puede ser también una mezcla de reacción PCR que comprende adicionalmente una muestra, como mínimo, parcialmente purificada de ácido nucleico a partir de la cual se amplificará una secuencia de ácido nucleico diana sospechosa de encontrarse presente en dicha muestra.

25 Además, dicha composición puede comprender compuestos fluorescentes para detectar el producto de amplificación correspondiente en tiempo real, y, respectivamente, sondas de hibridación etiquetadas 2, 3, 4, o 5-6 de forma diferente, no limitadas, pero seleccionadas dentro de un grupo que consiste en sondas de hibridación FRET, sondas TaqMan, Marcadores Moleculares ("Molecular Beacons") y sondas de Marcado Único, útiles para métodos de detección, tal como se explicarán más adelante. De manera alternativa, dicha composición puede comprender una entidad fluorescente de unión dsDNA, tal como SybrGreen, que emite fluorescencias solamente cuando está unida a un ADN de doble hebra.

En un tercer aspecto, la presente invención está dirigida a un kit que comprende, como mínimo

35 (i) un ADN polimerasa termoestable
(ii) un péptido de unión a Mg^{2+} sintético, tal como se ha indicado en lo anterior, y
(iii) una solución de $MgCl_2$ a efectos de ajustar la concentración final de Mg^{2+}
Preferentemente, dicho kit comprende, como mínimo

40 (i) un ADN polimerasa termoestable
(ii) un péptido de unión a Mg^{2+} sintético, tal como se ha indicado en lo anterior, y
(iii) una solución de $MgCl_2$ a efectos de ajustar la concentración final de Mg^{2+}
De manera más preferente, dicho kit comprende, como mínimo

45 (i) un ADN polimerasa termoestable
(ii) un péptido de unión a Mg^{2+} sintético, tal como se ha indicado en lo anterior, y
(iii) una solución de $MgCl_2$ a efectos de ajustar la concentración final de Mg^{2+}
(iv) una mezcla de ofdeoxynucleoside-tri-phosphates, y
50 (v) un tampón

Además, este kit, de acuerdo con la presente invención, puede ser un kit de parámetro específico, comprendiendo, como mínimo, un par de cebadores de amplificación. Este kit puede comprender también múltiples pares de cebadores de amplificación y, preferentemente, 2, 3, 4, o 5 pares de cebadores de amplificación.

55 Además, este kit puede comprender compuestos fluorescentes para detectar un correspondiente producto de amplificación en tiempo real y, respectivamente, 2, 3, 4, o 5-6 sondas de hibridación marcadas de forma diferente, no limitadas pero seleccionadas del grupo que consiste en sondas de hibridación FRET, sondas TaqMan, Marcadores Moleculares ("Molecular Beacons") y sondas de Marcado Único, útiles para métodos de detección, tal como se explicarán más adelante. De manera alternativa, dicho kit puede contener una entidad fluorescente de unión a dsDNA que emite fluorescencias solamente cuando se une a ADN de doble hebra. Por ejemplo, dicho kit puede comprender SybrGreen.

65 En una realización a título de ejemplo, dicho kit está adaptado específicamente para llevar a cabo RT-PCR de una etapa y comprende una mezcla de Taq ADN polimerasa y una transcriptasa inversa, tal como transcriptasa inversa AMV. En otra realización a título de ejemplo, este kit está adaptado específicamente para llevar a cabo RT-PCR en

tiempo real de una etapa y comprende una entidad detectora de ácido nucleico, tal como SybrGreen o una sonda de detección de ácido nucleico marcada de forma fluorescente.

5 Los componentes distintos pueden ser almacenados, cada uno de ellos individualmente en diferentes recipientes. De manera alternativa, los diferentes componentes pueden ser almacenados conjuntamente en un recipiente de almacenamiento. También, de forma alternativa, las combinaciones arbitrariamente seleccionadas de solamente un subconjunto de componentes (i) a (v) se pueden almacenar conjuntamente. En una realización preferente, se almacenan conjuntamente componentes tales como la enzima (i) o el tampón de reacción de enzima plus, conteniendo MgU₂, dNTPs (i, ii, iv, v) y el péptido.

10 En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para la amplificación de un ácido nucleico diana específico, comprendiendo las siguientes etapas:

- 15 - disponer una muestra que se sospeche que contiene dicho ácido nucleico objetivo
 - añadir una composición, tal como se ha dado a conocer en lo anterior
 - llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico

20 Los métodos para llevar a cabo y optimizar reacciones de amplificación de ácido nucleico son bien conocidos en esta técnica. En particular, el método más habitual utilizado en esta técnica es el de la reacción de cadena de polimerasa, tal como se ha dado a conocer en detalle en los documentos US 4.683.195, US 4.683.202 y US 4.965.188.

En particular, el método según la presente invención, comprende las siguientes etapas

- 25 a) disponer una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana que se debe amplificar
 b) disponer un péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente
 30 c) disponer ADN polimerasa, dNTPs, un tampón y una sal de Mg²⁺
 d) disponer un par de cebadores de amplificación diseñados para amplificar específicamente un ácido nucleico diana predefinido.

35 La adición de todos los componentes mencionados se puede realizar con un orden arbitrario. No obstante, a efectos de conseguir un efecto de arranque en caliente, es decir, a efectos de impedir un fallo de cebado y subsiguiente extensión de cebador a temperaturas más bajas antes del propio protocolo de amplificación de termociclado, es importante que dicho péptido sintético se añada a la mezcla de reacción antes de que se combinen el ADN polimerasa, los dNTPs y los cebadores de amplificación.

40 Si bien el mecanismo por el que dichos péptidos sintéticos que comprenden un lugar de unión de catión bivalente resultan en reacciones de amplificación más específicas no es conocido en detalle, es razonable aceptar que a temperaturas más bajas el péptido forma un complejo con Mg²⁺, que por su parte es conocido como cofactor de ADN polimerasas en reacciones de extensión de cebador. La formación compleja cuantitativa tiene como resultado la disminución de la concentración de Mg²⁺ libre, con la consecuencia de que la actividad de ADN polimerasa es inactivada debido a la falta de disponibilidad de su cofactor. Después de inicio del protocolo de ciclado a temperatura, el complejo termolábil entre el péptido sintético y el catión bivalente es resuelto y se dispone de Mg²⁺ nuevamente como cofactor para reacciones de extensión de cebador, catalizadas por polimerasa.

50 Preferentemente, el péptido sintético añadido durante la amplificación del ácido nucleico comprende el motivo de secuencia de aminoácido X₁X₂X₃, por lo menos una vez, en la que

X₁ es un aminoácido cargado negativamente, preferentemente ácido aspártico
 X₂ es Glicina o bien un aminoácido linfático
 55 X₃ es un aminoácido cargado negativamente.

En una realización, X₃ es un ácido glutámico.

60 En este caso, X₂ es preferentemente Isoleucina. También, de modo preferente, en el terminal C adyacente a X₃ existe un X₄ que es un aminoácido sin carga, polar, tal como treonina.

De modo más preferente, X₂ es Isoleucina y en el terminal C adyacente a X₃ existe un X₄ que es un aminoácido sin carga, polar, tal como treonina.

65 En otra realización, X₃ es un ácido aspártico.

En este caso, X2 es preferentemente Glicina. También, preferentemente, en el terminal N adyacente a X1 existe un X0 que es un aminoácido aromático, tal como Fenilalanina.

- 5 De manera más preferente, X2 es Isoleucina y en el terminal N adyacente a X1 existe un X0 que es un aminoácido aromático, tal como Fenilalanina.

En una realización específica, dicha reacción de cadena de polimerasa es monitorizada en tiempo real. Hay tres diferentes formatos de detección para dicha monitorización.

10

a) Formato TaqMan:

Se etiqueta una sonda de hibridación de hebra única con dos componentes: cuando el primer componente es excitado con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida es transferida al segundo componente, el llamado extintor ("quencher"), de acuerdo con el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Durante la etapa de reasociación de la reacción PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y es degradada por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa durante la fase subsiguiente de prolongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el extintor son separados espacialmente uno de otro, y de esta manera se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente. Se dan a conocer ensayos de sonda TaqMan en detalle en los documentos US 5.210.015, US 5.538.848, y US 5.487.972. Las sondas de hibridación TaqMan y mezclas de reactivos se dan a conocer en el documento US 5.804.375.

15

20

b) Formatos de liberación

Además, se han dado a conocer recientemente otros dos formatos restringidos a detección específica de alelo, que se basan en el principio de la detección específica de una liberación de nucleótido con terminal 3' etiquetado debido a la situación de correspondencia o falta de correspondencia con respecto a su unión con el ácido nucleico diana. El documento US 6.391.551 da a conocer un método caracterizado por el hecho de que el nucleótido con terminal 3' de una sonda de hibridación es liberado por una enzima de despolimerización en el caso de que haya tenido lugar una correspondencia perfecta entre la secuencia diana y la sonda. De manera similar, el documento EP 0 930 370 sugiere la utilización de un cebador etiquetado con un indicador ("reporter") y una fracción extintora, caracterizada porque una actividad de lectura 3'-5' elimina una fracción en el caso de que no exista correspondencia perfecta entre el cebador y la diana de amplificación.

25

30

35

c) Indicadores Moleculares ("Molecular Beacons"):

Estas sondas de hibridación están etiquetadas también con un primer componente y con un extintor, estando localizadas preferentemente las etiquetas en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran en proximidad espacial en solución. Después de hibridación a los ácidos nucleicos diana, ambos componentes son separados uno de otro, de manera que después de excitación con luz de una longitud de onda adecuada la emisión de fluorescencia del primer componente puede ser medida (US 5.118.801).

40

d) Sondas de hibridación FRET.

El formato de prueba de la sonda de hibridación FRET es especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogéneos (Matthews, J.A., and Kricka, L.J., Analytical Biochemistry 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondas de hibridación de hebra única que se utilizan simultáneamente y son complementarias de sitios adyacentes de la misma hebra del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas son etiquetadas con diferentes componentes fluorescentes. Una vez excitadas con luz de longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, de manera que se puede medir la emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondas de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar. De manera alternativa, a la monitorización del incremento de fluorescencia del componente receptor FRET, también es posible monitorizar la disminución de la fluorescencia del componente donante FRET como medición cuantitativa del evento de hibridación.

45

50

55

En particular, el formato de sonda de hibridación FRET se puede utilizar en una PCR en tiempo real a efectos de detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de PCR en tiempo real, el formato de la sonda de hibridación FRET se ha demostrado altamente sensible, exacta y fiable (WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Como alternativa a la utilización de dos sondas de hibridación FRET, es posible también utilizar un cebador etiquetado de forma fluorescente y solamente una sonda de oligonucleótido etiquetada (Bernard, P.S., y otros, Analytical Biochemistry 255 (1998) 101-107). A este respecto, se puede escoger de forma arbitraria si el cebador es etiquetado con el donante FRET o el compuesto aceptor de FRET.

60

65

e) Formato de sonda de etiqueta única (SLP):

El formato de detección consiste en un oligonucleótido único, etiquetado con un único tinte fluorescente en el extremo 5' o en el extremo 3' (WO 02/14555). Se pueden utilizar dos diseños diferentes para oligoetiquetado: sondas de apagado G ("G-Quenching Probes") y sondas de desapagado con Nitroindol ("dequenching"). En la realización de apagado G, el tinte fluorescente es fijado a un terminal oligo 5' o 3'.

La fluorescencia disminuye significativamente cuando la sonda es hibridada con la diana en el caso de que dos G' están situadas en la hebra diana en oposición a C y en la posición 1 al lado de la sonda de oligonucleótido suplementaria. En la realización de sondas de des-extinción ("dequenching") de nitroindol, el tinte fluorescente es fijado al nitroindol en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. El nitroindol disminuye en cierta medida la señalización fluorescente de la sonda libre. La fluorescencia aumenta cuando la sonda es hibridada con el ADN diana debido al efecto de des-extinción ("dequenching").

f) Formato SybrGreen:

Se encuentra también dentro del ámbito de la invención llevar a cabo PCR en tiempo real en presencia de un aditivo, según la invención, en caso de que el producto de amplificación es detectado utilizando una fracción de unión de ácido nucleico de doble hebra. Por ejemplo, el correspondiente producto de amplificación puede ser también detectado de acuerdo con la invención por un tinte de unión a ADN fluorescente que emite una señal de fluorescencia correspondiente cuando tiene lugar la interacción con el ácido nucleico de doble hebra después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada. Los tintes SybrGreen y SybrGold (sondas moleculares) se han demostrado especialmente adecuadas para esta aplicación. Se pueden utilizar de manera alternativa tintes de intercalación. No obstante, para este formato, para discriminar los diferentes productos de amplificación, es necesario llevar a cabo un análisis de la correspondiente curva de fusión (US 6.174.670).

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a métodos caracterizados por el hecho de que se utiliza un péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de un catión bivalente, tal como se ha indicado con anterioridad, para PCR en tiempo real y análisis subsiguiente de la curva de fusión.

Debido al hecho de que la detección de amplicon en tiempo real con el formato SybrGreen no puede discriminar entre productos específicos y elementos de amplificación, tales como cebador/dímero, se lleva a cabo usualmente un análisis subsiguiente de curva de fusión. Después de terminar la reacción PCR, se incrementa constitutivamente la temperatura de la muestra y se detecta la fluorescencia de siempre que SybrGreen está unido al ADN de doble hebra presente en las muestras. Después de la disociación del ADN de doble hebra, la señal disminuye inmediatamente. Esta disminución es controlada mediante una fluorescencia apropiada con respecto al gráfico temperatura-tiempo, de manera tal que se puede determinar un primer valor derivado en el que se observa la disminución máxima de la fluorescencia. Dado que los ADN de doble hebra de cebador/dímero son habitualmente cortos, la disociación en ADN de hebra única tiene lugar a temperaturas más bajas en comparación con la disociación del producto de amplificación específico de doble hebra.

Si durante un análisis de curva de fusión se encuentra presente un péptido sintético con un lugar de unión de catión bivalente dentro de la muestra, se obtienen curvas mucho más claras en muchos casos cuando se determina la primera derivada de una respectiva fluorescencia con respecto al gráfico de temperatura-tiempo.

Además de PCR y PRC en tiempo real, se utilizan sondas de hibridación FRET para análisis de curva de fusión. En este ensayo, el ácido nucleico diana es amplificado en primer lugar en una reacción PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden encontrarse ya presentes durante la reacción de amplificación o se pueden añadir a continuación. Después de terminar la reacción PCR, la temperatura de la muestra se incrementa constitutivamente y se detecta la fluorescencia siempre que la sonda de hibridación estuviera unida al ADN objetivo. A la temperatura de fusión las sondas de hibridación son liberadas de su diana, y la señal fluorescente disminuye inmediatamente hasta el nivel de fondo. Esta disminución es monitorizada con un gráfico apropiado de fluorescencia con respecto a temperatura-tiempo, de manera que se puede determinar el primer valor derivado para el que se observa la máxima disminución de fluorescencia.

Si durante dicho análisis de curva de fusión un péptido sintético con una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente, se encuentra presente en la muestra, se obtienen curvas mucho más definidas cuando se define la primera derivada de un gráfico correspondiente de fluorescencia con respecto a temperatura-tiempo. Se pueden observar efectos similares si se utilizan indicadores moleculares o sondas etiquetadas únicas como entidades de detección para análisis de curva de fusión.

El siguiente ejemplo, listado de secuencias y figuras se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real queda definido por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos**Ejemplo 1:**

- 5 Se sintetizó un péptido con la secuencia H-DIETDIET-NH₂, se purificó por HPLC, se liofilizó y se disolvió en 30 mM Tris-HCl, pH 8.5. Se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen de 50 µl conteniendo 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng or 1 ng de ADN genómico humano, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), 0,4 mM de cebador directo (aga cag tac agc cag cct ca) (SEQ ID No: 1), 0,4 de cebador inverso (gac ttc aaa ttt ctg ctc ctc) (SEQ ID N^o: 2), 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP y dCTP, tampón de reacción Taq PCR (Roche Applied Science Cat. N^o. 11146165001), con o sin péptido H-DIETDIET-NH₂. La reacción PCR fue llevada a cabo del modo siguiente: dos minutos a 94^o C, 35 ciclos con 10 segundos a 94^o C, 30 segundos a 60^o C, y 30 segundos a 72^oC, y un paso final de alargamiento de 7 minutos a 72^o C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa.
- 10
- 15 Tal como se puede apreciar en la figura 1, la adición de 2,0 mM del péptido que se da a conocer tiene como resultado una reducción significativa de la generación de productos de amplificación de cebador/dímero.

Ejemplo 2:

- 20 Análisis de un péptido con la secuencia H-FDGDFDGD-NH₂. Se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen de 50 µl conteniendo 25 ng o, 10 ng de ADN genómico humano, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), 0,4 mM de cebador directo (aga cag tac agc cag cct ca) (SEQ ID NO: 1), 0,4 mM cebador inverso (agt atg ccc ccg cac agg a) (SEQ ID NO: 3), 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP y dCTP, tampón para reacción Tap PCR (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), con y sin péptido H-FDGDFDGD -NH₂. Las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, 35 ciclos con 10 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C y una etapa de prolongación final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa.
- 25

- 30 Tal como se puede apreciar en la figura 2, la añadidura de 3 mM H-FDGDFDGD-NH₂ tiene como resultado la disminución de la formación del producto de cebador/dímero. En paralelo, se observa un aumento de la formación del producto específico.

Ejemplo 3:

- 35 Se analizó el péptido con la secuencia H-DIETDIET-NH₂ en tiempo real por RT-PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl conteniendo 102, 103, 104, 105 y 106 copias de estándar ARN disponible en el kit LightCycler h-G6PDH Housekeeping gene de la firma Roche Applied Science (Cat. No.: 3261883), 2,4 unidades de Transcriptor y 1,6 unidades de tampón de reacción de polimerasa de arranque rápido (FastStart), tampón de reacción del kit de amplificación de LightCycler RNA SYBR Green (Roche Applied Science Cat. No. 12 015 137 001), 0,5 mM de cebador directo (ggg tgc atc ggg tga cct g) (SEQ ID NO: 4), 0,5 mM de cebador inverso (agc cac tgt gag gcg gga) (SEQ ID NO: 5), con y sin péptido 1 mM H-DIETDIET-NH₂. La reacción PCR fue llevada a cabo en un LightCycler 2.0 del modo siguiente: 10 min a 55 °C, 10 min a 95 °C, 45 ciclos con 10 seg a 95 °C, 10 seg a 55 °C y 13 seg a 72 °C.
- 40

- 45 El resultado de este ejemplo se ha mostrado en la figura 3. Éste muestra que un péptido de unión de magnesio reduce la formación de cebador-dímero en la reacción RT-PCR. Las curvas de amplificación (figura 3a) muestran que en ausencia de péptido se forma un producto no específico. Los productos de PCR amplificados a partir de 102, 103 y 104 copias de la diana se detectan en valores similares cp. Las curvas de amplificación se pueden deducir de varios productos formados. En el análisis de la curva de fusión que se ha mostrado en la figura 3b dos perfiles de fusión son detectables con 103 y 102 copias del ARN diana. Con estas diluciones de la diana, las curvas de fusión muestran dos productos.
- 50

- La figura 3c muestra curvas de amplificación en presencia de 1 mM de péptido de unión de magnesio. Los productos de amplificación de las diluciones diana son detectados en puntos de cruce crecientes, encontrándose las curvas de amplificación bien separadas. También se observa en el análisis de la curva de fusión de la figura 3d un incremento de especificidad en comparación con un experimento sin péptido de unión de magnesio. En una curva de fusión con el T_m del producto específico se detecta de manera exclusiva las diluciones diana de 106 a 103. En la muestra con 102 copias de diana, el producto principal es el producto específico, observándose muy poco cebador-dímero.
- 55

Ejemplo 4:

- 60 Se sintetizó un péptido con la secuencia H-DIETDIETDIET-NH₂ (SEQ ID NO: 8), se purificó con HPLC, se liofilizó y se disolvió en 30 mM Tris-HCl, pH 8,5. Se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen de 50 µl conteniendo 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, o 1 ng de ADN genómico humano, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), 0,4 mM de cebado directo (cac ccc gtg ctg ctg acc ga) (SEQ ID NO: 6), 0,4 mM de cebador
- 65

inverso (agg gag gcg gcc acc aga ag) (SEQ ID NO: 7), 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP y dCTP, tampón de reacción Tap PCR (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), con y sin péptido H-DIETDIETDIET-NH2 en cantidades que se indican en la figura 4. La reacción PCR fue llevada cabo del modo siguiente: 2 min a 94 °C, 35 ciclos con 10 seg a 94 °C, 30 seg a 65 °C y 15 seg a 72 °C y etapa final de prolongación a 7 min a 72 °C. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa.

La figura 4 muestra el efecto del péptido de unión de magnesio con la secuencia DIETDIETDIET. La formación de producto cebador dímero (\Rightarrow) se suprime cuando el péptido se encuentra presente en la mezcla de reacción PCR sin influencia en la formación de producto específico (\rightarrow).

Ejemplo 5:

Se sintetizó un péptido con la secuencia H-DIET-NH2, se purificó por HPLC, se liofilizó y se disolvió en 30 mM Tris-HCl, pH 8,5. Se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen de 50 μ l conteniendo 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, o 1 ng de ADN genómico humano, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), 0,4 mM de cebador directo (aga cag tac agc cag cct ca) (SEQ ID NO: 1), 0,4 mM de cebador inverso (gac ttc aaa ttt ctg ctc ctc) (SEQ ID NO: 2), 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP y dCTP, tampón de reacción Taq PCR (Roche Applied Science Cat. No. 11146165001), con y sin péptido H-DIET-NH2. La PCR fue llevada a cabo del modo siguiente: 2 min a 94 °C, 35 ciclos con 10 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C y etapa final de prolongación de 7 min a 72 °C. Los productos de la reacción PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa. Se observó una disminución en la formación de cebador/dímero en presencia de, como mínimo, 3 mM HDIET-NH2.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
<120> PCR Arranque en caliente por secuestro de magnesio
<130> 23634 WO
<150> EP 06003903
30 <151> 2006-02-27
<160> 8
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 20
35 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 1
40 agacagtaca gccagcctca 20
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
45 <220>
<223> cebador
<400> 2
gactcaaat ttctgctct c 21
<210> 3
50 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
55 <400> 3
agtatgcccc cgacacagga 19
<210> 4
<211> 19
<212> DNA
60 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 4
gggtgcatcg ggtgacctg 19
65 <210> 5

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> primer
 <400> 5
 agccactgtg aggcggga 18
 <210> 6
 <211> 20
 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer
 <400> 6
 15 caccctgtgc tgctgaccga 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> primer
 <400> 7
 agggaggcgg ccaccagaag 20
 <210> 8
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de unión a magnesio
 30 <400> 8

 Asp Ile Glu Thr Asp Ile Glu Thr Asp Ile Glu Thr
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido sintético seleccionado entre el grupo que consiste en
 5 H-DIET-NH2
 H-DIETDIET-NH2
 H-DIETDIETDIET-NH2
 y H-FDGDFDGD-NH2.
2. Composición que comprende
 10 - una DNA polimerasa termoestable
 - como mínimo un tipo de catión bivalente, preferentemente Mg²⁺
 - desoxinucleótidos
 - un tampón
 15 - un péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente.
3. Composición, según la reivindicación 2, que comprende además, como mínimo, un compuesto de ácido nucleico.
- 20 4. Kit que comprende
 - un péptido sintético que tiene una longitud no superior a 30 aminoácidos, comprendiendo un lugar de unión de catión bivalente
 - un ADN polimerasa termoestable.
- 25 5. Método para la amplificación de un ácido nucleico diana específico que comprende las siguientes etapas:
 - disponer una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana
 - añadir una composición, según las reivindicaciones 2-3
 - llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico.
- 30 6. Método, según la reivindicación 5, **caracterizado porque** dicha reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción de cadena de polimerasa que es monitorizada en tiempo real.
- 35 7. Método, según las reivindicaciones 5-6, **caracterizado porque** el producto de amplificación generado por dicha amplificación es sometido a análisis de curva de fusión.

Fig. 1

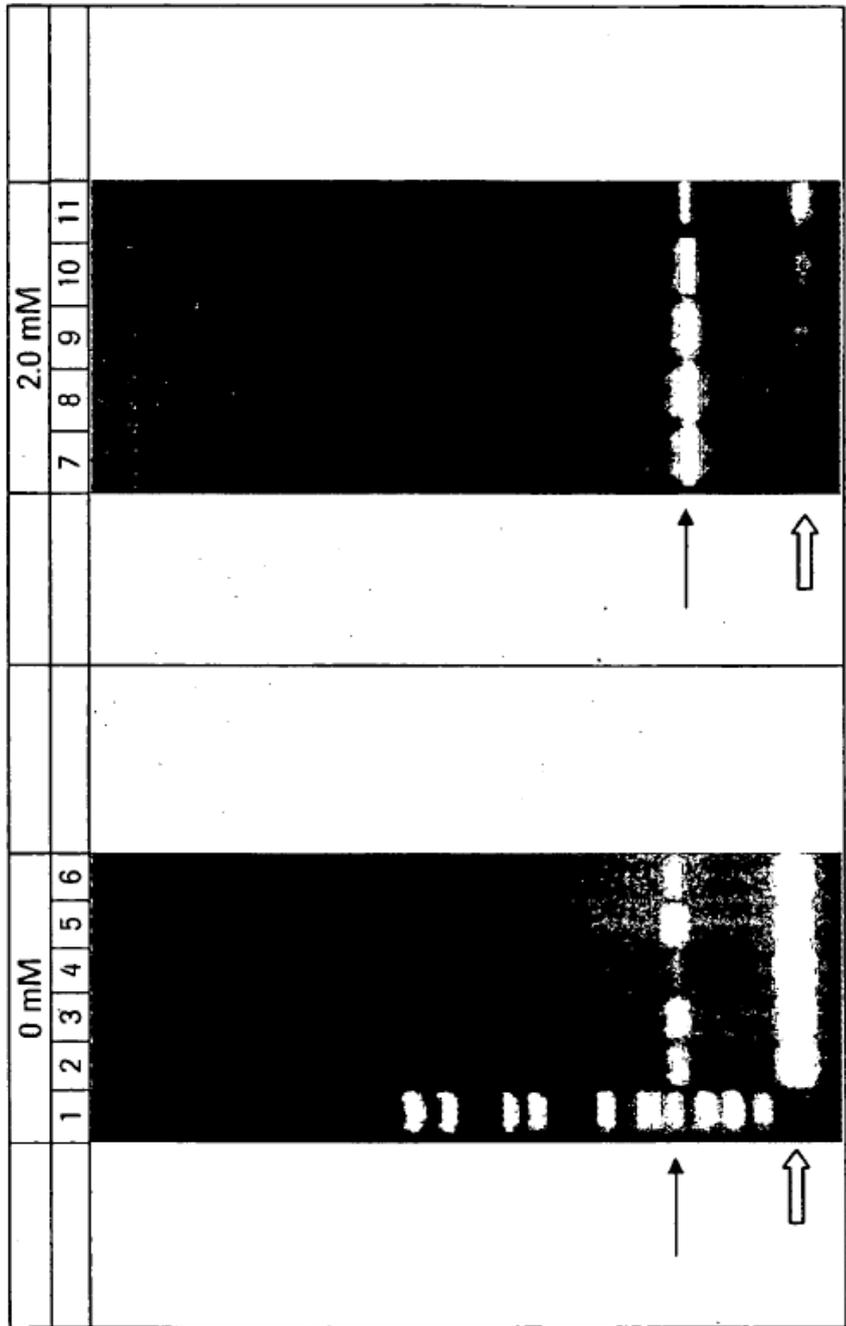


Fig. 2

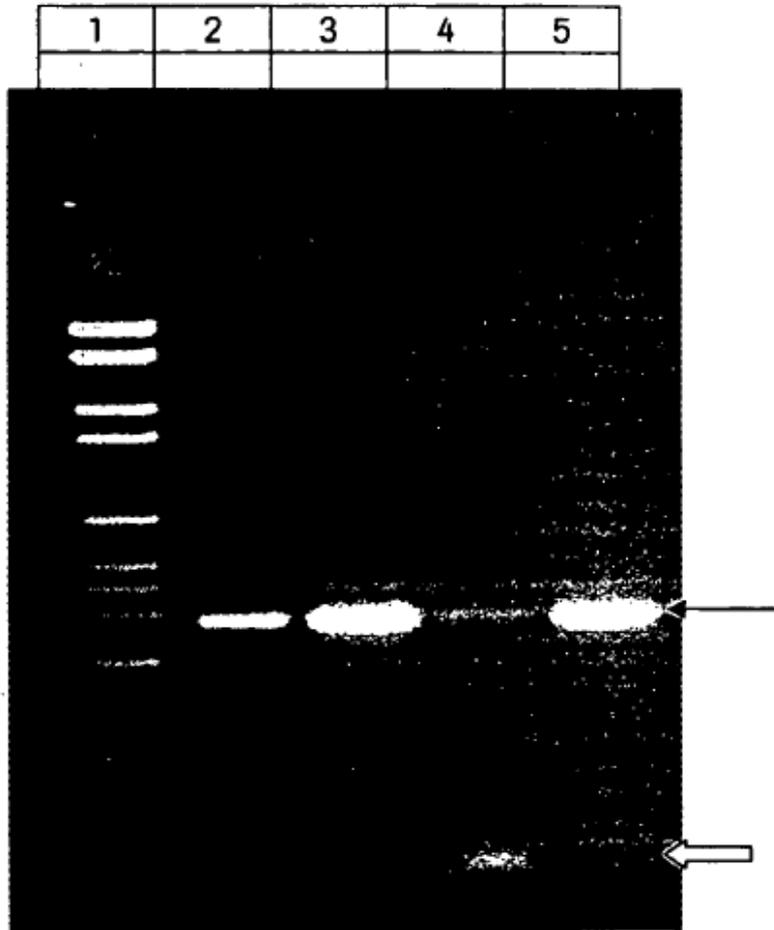


Fig. 3a

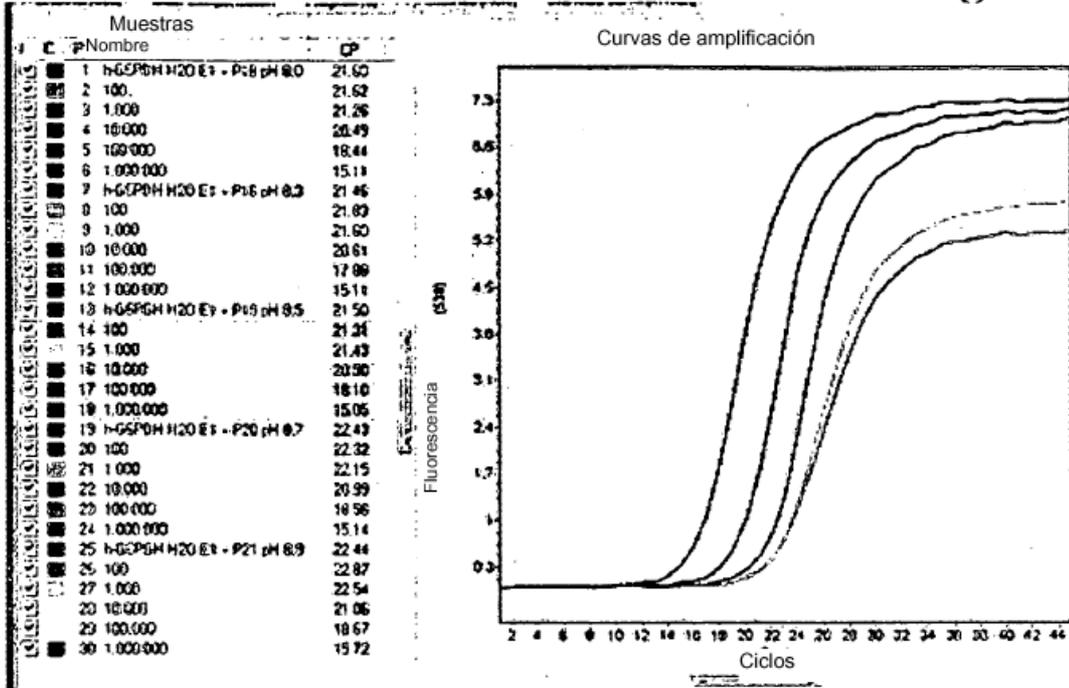


Fig. 3b

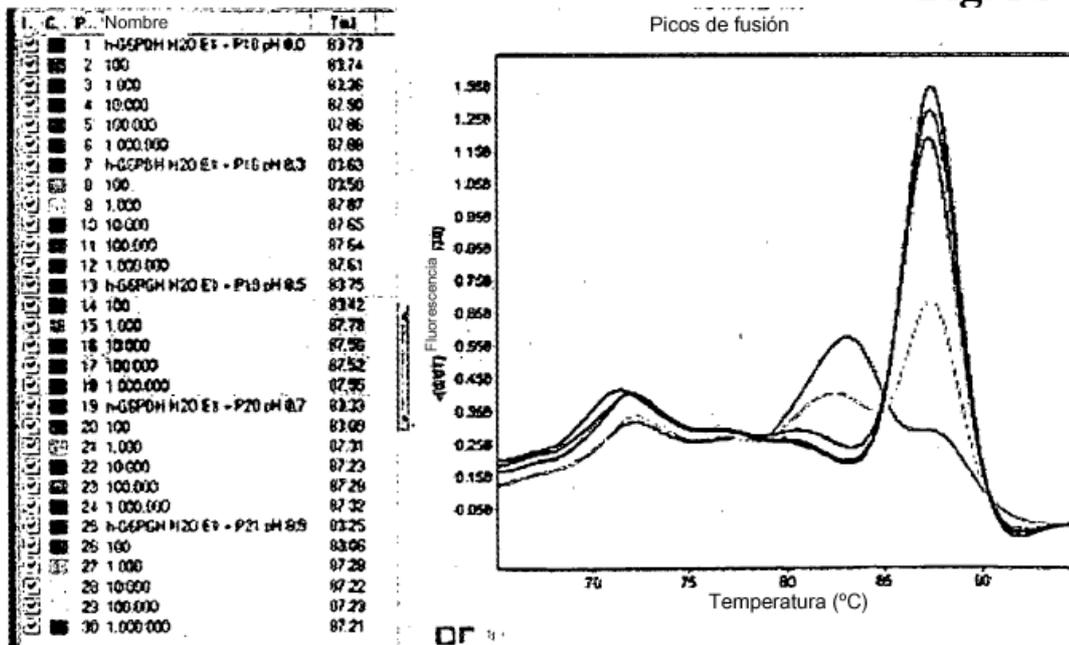


Fig. 3c

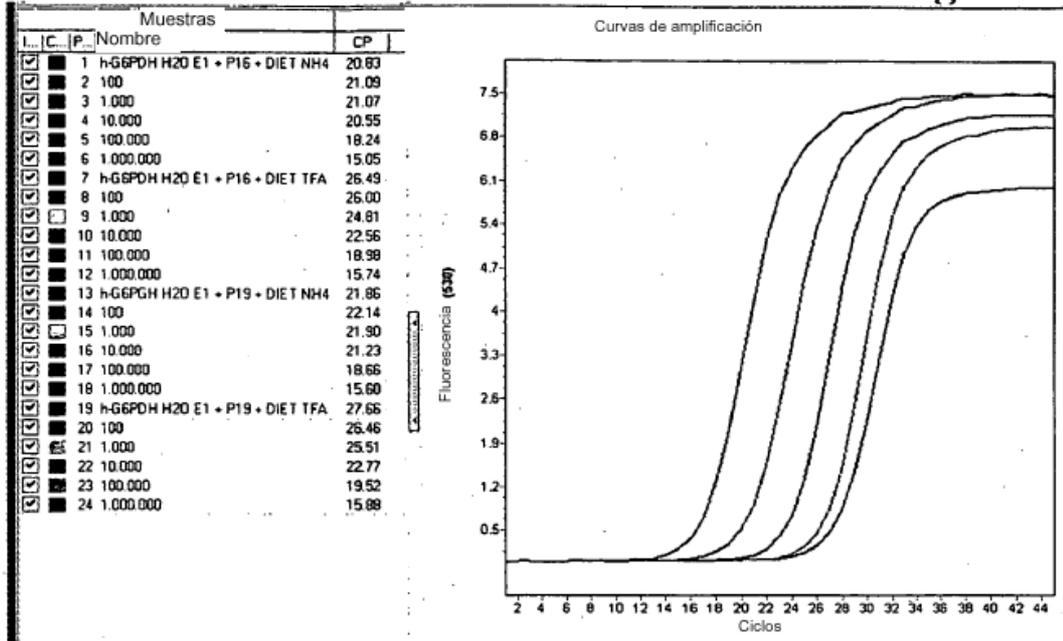


Fig. 3d

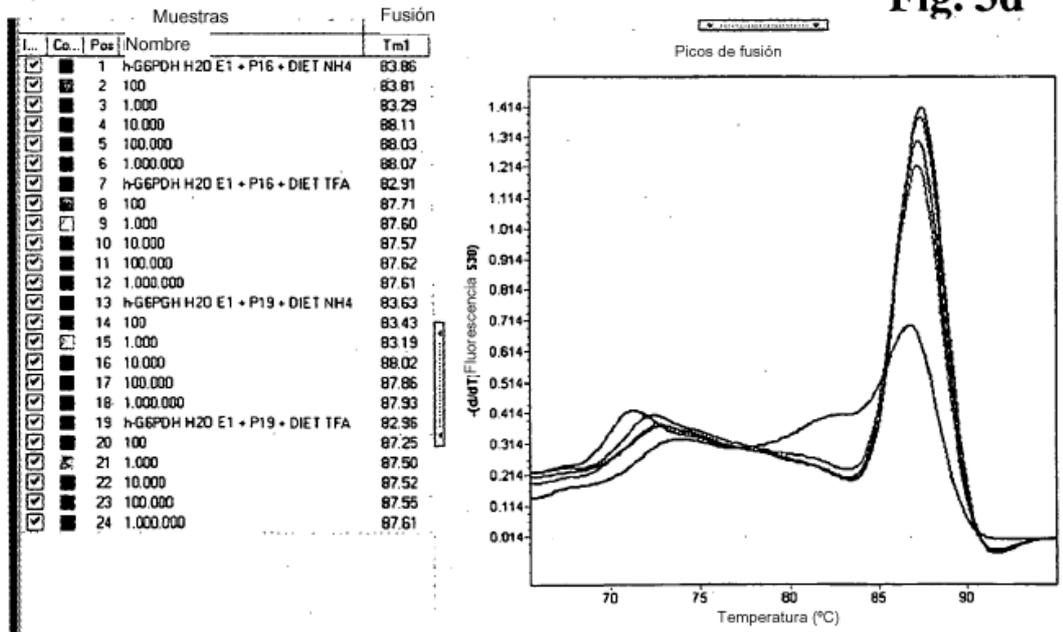


Fig. 4

