



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 469**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09011394 .5**
96 Fecha de presentación : **05.09.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2163556**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **Polianión para la amplificación mejorada de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **09.09.2008 EP 08015812**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2011

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

72 Inventor/es: **Ankenbauer, Waltraud;**
Heindl, Dieter;
Kolb, Renate;
Laue, Frank y
Walter, Eva

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 367 469 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

Polianión para la amplificación mejorada de ácidos nucleicos

5 La presente invención se refiere al ámbito de las reacciones de extensión con cebador catalizadas con polimerasa dependientes de molde, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Más precisamente, la presente invención proporciona un método nuevo para realizar una PCR "hot start" caracterizada porque se evita la amplificación inespecífica de dímeros del cebador añadiendo un polianión definido antes de la reacción de amplificación.

10 Antecedentes de la invención

Un problema importante de la amplificación de ácido nucleico y más especialmente de la PCR es la generación de productos de amplificación inespecíficos. En muchos casos, esto se debe a un cebado inespecífico de oligonucleótidos y al posterior acontecimiento de extensión con cebador antes del procedimiento de termociclado propiamente dicho, ya que las polimerasas de DNA termoestables son también moderadamente activas a temperatura ambiente. Por ejemplo, se observan a menudo productos de amplificación debidos a la dimerización del cebador que puede ocurrir fortuitamente y posterior extensión de los dímeros. Con el fin de superar este problema, es bien conocida en la técnica la realización de una PCR llamada "hot start", en la que se separa de la mezcla reaccionante un componente esencial para la reacción de amplificación o bien se mantiene este componente en estado inactivo hasta que la temperatura de la mezcla reaccionante se eleva una primera vez. Dado que la polimerasa no puede funcionar en estas condiciones, no se produce elongación del cebador durante el período en el que los cebadores se pueden unir de modo no específico. Con el fin de conseguir este efecto, se han aplicado diversos métodos:

25 a) Separación física de la polimerasa de DNA

La separación física puede conseguirse por ejemplo con una barrera de cera sólida, que separa el compartimento que contiene la polimerasa de DNA del compartimento que contiene el grueso de reactivos restantes. Durante el primer paso de calentamiento se funde la cera automáticamente y se mezclan los compartimentos líquidos (Chou, Q. y col., Nucleic Acids Res. 20, 1717-23, 1992, US-5,411,876). Como alternativa se inmoviliza por afinidad la polimerasa de DNA sobre un soporte sólido antes de la reacción de amplificación y solamente se libera a la mezcla de reacción cuando el calor provoca dicha liberación (Nilsson, J. y col., Biotechniques 22, 744-51, 1997). Sin embargo, ambos métodos requieren mucha dedicación de tiempo (personal) y son muy laboriosos de ejecución.

35 b) Modificación química de la polimerasa de DNA

Para este tipo de PCR "hot start", la polimerasa de DNA se inactiva de modo reversible como resultado de una modificación química. Más en concreto, se introducen grupos de bloqueo, lábiles al calor, en la polimerasa de DNA Taq, con lo cual se inactiva la enzima a temperatura ambiente (US 5,773,258). Estos grupos de bloqueo se eliminan a temperatura elevada durante el paso previo de la PCR, con lo cual se activa la enzima. Esta modificación lábil al calor se obtiene por ejemplo por condensación del anhídrido citracónico o del anhídrido aconítico con los restos lisina de la enzima (US 5,677,152). Las enzimas que llevan este tipo de modificaciones ya son productos comerciales, por ejemplo el Amplitaq Gold (Moretti, T. y col., Biotechniques 25, 716-22, 1998) o la polimerasa de DNA FastStart (Roche Molecular Biochemicals). Sin embargo, la introducción de los grupos de bloqueo se efectúa mediante una reacción química que puede tener lugar arbitrariamente en cualquiera de los restos lisina estéricamente disponibles. Por consiguiente, la reproducibilidad y la calidad de las preparaciones de enzimas modificadas químicamente pueden variar y es muy difícil de controlar.

45 c) Modificación recombinante de la polimerasa de DNA

50 Se han obtenido por ingeniería genética mutantes de la polimerasa Taq sensibles al frío. Estas mutantes difieren de la enzima de tipo salvaje por carecer del extremo N (US 6,241,557). A diferencia de la polimerasa Taq recombinante de tipo nativo o salvaje, estas mutantes son completamente inactivas por debajo de 35°C, de modo que pueden utilizarse en algunos casos para realizar una PCR "hot start". Sin embargo, la forma mutante truncada por el extremo N y sensible al frío requiere condiciones de tampón salino bajo, se procesa peor que la enzima de tipo salvaje y por ello solo puede utilizarse para la amplificación de ácidos nucleicos diana cortos. Además, debido a que la forma truncada carece de actividad de exonucleasa 5'-3', no puede utilizarse para los ensayos de PCR en tiempo real, basados en el formado de detección TaqMan.

60 d) Inhibición de la polimerasa de DNA con aditivos de ácido nucleico

Se ha demostrado que la extensión de cebadores fusionados de modo no específico puede inhibirse con la adición de fragmentos cortos de DNA de doble hebra (Kainz, P. y col., Biotechniques 28, 278-82, 2000). En este caso, la extensión del cebador se inhibe a temperaturas inferiores al punto de fusión del fragmento corto de DNA de doble hebra, pero de modo independiente de la secuencia del DNA competidor propiamente dicho. Sin embargo no se sabe en qué medida influye el exceso de DNA competidor en el rendimiento de la reacción de amplificación de ácido nucleico.

Como alternativa pueden utilizarse aptámeros de oligonucleótido que tengan una secuencia específica que se traduce en una estructura secundaria definida. Estos aptámeros pueden seleccionar empleando la tecnología SELEX para conseguir una afinidad muy elevada con respecto a la polimerasa de DNA (US 5,693,502, Lin, Y. y Jayasena, S.D., J. Mol. Biol. 271, 100-11, 1997). La presencia de estos aptámeros dentro de la mezcla de amplificación antes del proceso de termociclado propiamente dicho se traduce a su vez en una gran afinidad de fijación sobre la polimerasa de DNA y por consiguiente en la inhibición lábil al calor de su actividad (US 6,020,130). Sin embargo, debido al proceso de selección, todos los aptámeros disponibles solo podrán utilizarse en combinación con una polimerasa concreta de DNA.

e) Anticuerpos de DNA Taq

Una estrategia alternativa para conseguir una inhibición lábil al calor de la polimerasa de DNA Taq consiste en la adición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la enzima purificada (Kellogg, D.E. y col., *Biotechniques* 16, 1134-7, 1994; Sharkey, D.J. y col., *Biotechnology (N Y)* 12, 506-9, 1994). Al igual que los aptámeros de oligonucleótidos, el anticuerpo se fija sobre la polimerasa de DNA Taq con una gran afinidad a temperatura ambiente en modo inhibidor (US 5,338,671). El complejo se destruye en el paso de precalentamiento previo al proceso de termociclado propiamente dicho. Esto una prolongación que requiere mucha dedicación de tiempo en su conjunto, en especial si se aplican métodos de termociclado rápido (WO 97/46706).

En la patente US 5,985,619 se describe una forma específica de ejecución para realizar la PCR empleando un anticuerpo "hot start", en ella, aparte de la polimerasa Taq se añade p.ej. la exonucleasa III de la *E. coli* como suplemento de la mezcla de amplificación con el fin de digerir los compuestos intermedios de dímeros de cebador inespecíficos. Tal como se ha mencionado antes, la exonucleasa III reconoce el DNA de doble hebra como sustrato, al igual que por ejemplo los híbridos diana/cebador o de diana/producto de extensión de cebador. La digestión tiene lugar mediante la rotura del enlace de fosfodiéster del extremo 5' del resto desoxinucleótido terminado en 3'. Este tipo de exonucleasa es activa a temperatura ambiente, por lo tanto se digerirán todos los cebadores y los productos de extensión de cebador fusionados de modo inespecífico. De aquí derivan algunas formas de ejecución, en las que se logra una especificidad incluso mayor de la reacción de amplificación. Es más, la digestión de los cebadores inespecíficos dependiente de la duración del período de preincubación puede conducirse a una disminución sustancial e incontrolada de la concentración de cebador, que a su vez puede afectar a la reacción de amplificación propiamente dicha.

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

En los documentos EP 0 799 888 y GB 2293238 se describe la adición de oligonucleótidos bloqueados en el extremo 3' a las reacciones PCR. Debido al bloqueo del extremo 3', estos oligonucleótidos no pueden actuar como cebadores. Los oligonucleótidos bloqueados se diseñan para competir/interaccionar con los cebadores de la PCR, lo cual se traduce en una reducción de los productos no específicos.

Otra alternativa consiste en el uso de cebadores oligonucleótido fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de las reacciones PCR (EP 0 744 470). En este caso, una exonucleasa 3', que normalmente acepta sustratos de DNA de doble hebra y también sustratos de DNA de hebra simple, degrada los artefactos dúplex, por ejemplo los dímeros de cebador y también los amplicones remanentes (carry over amplicons), dejando sin degradar los cebadores de amplificación de hebra simple. De igual manera se ha sugerido el uso de cebadores con el extremo 3' modificado básico y la eliminación por acción de la exonucleasa IV de *E. coli* dependiente de molde (US 5,792,607).

Una forma de ejecución concreta de esta idea general se encuentra en el documento EP 1 275 735. En su descripción se publica una composición para realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende (i) una polimerasa de DNA termoestable, (ii) una exonucleasa 3'-5' termoestable, y (iii) por lo menos un cebador para la amplificación de ácido nucleico con un resto terminal 3' modificado que no se alarga con dicha polimerasa de DNA termoestable así como métodos para llevar a cabo la reacción PCR empleando esta composición.

Sin embargo, el principal inconveniente de las alternativas descritas consiste en que para cada reacción PCR se requieren cebadores modificados, lo cual implica un aumento del coste de cada ensayo individual.

g) Otros aditivos para la PCR

Otros aditivos orgánicos ya conocidos en la técnica, por ejemplo el DMSO, las betaínas y las formamidas (WO 99/46400; Hengen, P.N., *Trends Biochem. Sci.* 22, 225-6, 1997; Chakrabarti, R. y Schutt, C.E., *Nucleic Acids Res.* 29, 2377-81, 2001) permiten conseguir una mejora de la amplificación de las secuencias ricas en GC, más que la prevención de la formación de dímeros del cebador. De manera similar, la heparina puede estimular la transcripción continua "in vitro" presumiblemente por eliminación de proteínas de tipo histonas, con el fin facilitar el acceso al DNA cromosómico (Hildebrand, C.E. y col., *Biochimica et Biophysica Acta* 477, 295-311, 1977).

Se sabe también que la adición de una proteína de fijación de hebra simple (US 5,449,603) o tRNA (Sturzenbaum, S.R., Biotechniques 27, 50-2, 1999) se traduce en una asociación no covalente de estos aditivos con los cebadores. Esta asociación se rompe por calentamiento durante la PCR. Se ha constatado también que la adición de helicasas de DNA impide la fusión aleatoria de los cebadores (Kaboev, O.K. y col., Bioorg. Khim. 25, 398-400, 1999). Además en varios casos se puede emplear el poli-glutamato (WO 00/68411) con el fin de inhibir la actividad de la polimerasa a temperaturas bajas.

Se sabe además que los inhibidores polianiónicos de la polimerasa pueden controlar la actividad de la polimerasa termoestable de DNA en función de la temperatura de incubación aplicada. En la patente US 6,667,165 se describe una forma de ejecución de tipo "hot start", caracterizada porque los complejos de polimerasa inactiva-inhibidor se forman a temperaturas inferior a 40°C. Entre 40°C y 55°C, el inhibidor compite con el DNA del molde para fijarse sobre la polimerasa Taq, mientras que a temperaturas superiores a 55°C el inhibidor resulta desplazado del sitio activo de la polimerasa. Es más, el inhibidor tiende a reducir el rendimiento de producto que puede obtenerse cuando se emplean cebadores con temperatura de fusión más baja.

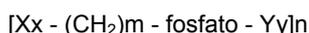
h) Secuestro del magnesio

Dado que se sabe desde hace mucho tiempo que las polimerasas termoestables se activan únicamente en presencia de cationes Mg^{2+} , se ha intentado realizar el secuestro del magnesio antes de iniciar el termociclado con el fin de evitar el cebado erróneo y la extensión inespecífica del cebador. Tal como se ha descrito en la patente US-6,403,341, el Mg^{2+} puede estar presente en forma de precipitado y, de este modo, estar disponible en el inicio de la reacción de amplificación. Cuando se eleva la temperatura durante la primera ronda del termociclado, el precipitado se disuelve y el Mg^{2+} queda totalmente disponible durante los 3 primeros ciclos. Se ha constatado que esta solución puede aplicarse fácilmente y que es capaz de proporcionar buenos resultados de "hot start". Por otro lado, esta solución no permite la preparación de mezclas concentradas (mastermixes) que contienen todos los reactivos, excepto el cebador y el ácido nucleico diana, que son necesarias para realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico. Por consiguiente es complicada la reproducibilidad de los datos y también la comparación de los datos correspondiente a diferentes ensayos. Además se ha publicado que se puede añadir péptidos que se fijan sobre el Mg^{2+} a la solución de amplificación con el fin de generar el deseado efecto "hot start" (PCT/EP-2007/001585).

Visto el estado de la técnica anterior, un objeto de la invención consiste en proporcionar una composición alternativa mejorada y un método de PCR "hot start", que permita inhibir el cebado inespecífico y la extensión del cebador no solo antes del proceso de amplificación propiamente dicho, sino también el proceso de termociclado. Más en concreto, un objeto de la invención consiste en proporcionar una composición alternativa y un método de PCR "hot start", en el que no tenga lugar la extensión de cebadores fusionados de modo no específico.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto químico que tiene la estructura:



caracterizada porque

$$\begin{aligned} 3 \leq m \leq 6, \\ 30 \leq n \leq 60 \end{aligned}$$

cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1,

cada X e Y con independencia entre sí son una entidad elegida entre el grupo formado por restos nucleósido, restos (desoxi)nucleósido y análogos de nucleósido o de (desoxi)nucleósido, con la condición de que cada uno de m, x e y se elija con independencia para cada unidad $[Xx - (CH_2)_m - \text{fosfato} - Yy]$ y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además con la condición de que el Y terminal pueda ser también -H o un grupo $(CH_2)_m - OH$.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que contiene:

- un compuesto definido previamente
- una polimerasa de DNA,
- y desoxi-oligonucleósidos trifosfatos.

En una forma específica de ejecución, dicha composición contiene además un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizado porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un kit que contiene:

- un compuesto definido previamente
- una polimerasa de DNA,
- y desoxi-oligonucleósidos trifosfatos.

En una forma específica de ejecución, el kit contiene además un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizado porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método que consta de los pasos siguientes:

- 5
- aportar una mezcla que contiene un ácido nucleico
 - aportar una composición descrita previamente
 - aportar por lo menos un primer cebador oligonucleótido,
 - realizar una reacción de extensión del cebador catalizada con la polimerasa.

10 En una forma de ejecución, dicho ácido nucleico es un DNA. En otra forma de ejecución, dicho ácido nucleico es un RNA y dicha polimerasa de DNA tiene actividad de transcriptasa inversa.

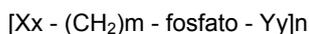
15 En una forma específica de ejecución, dicha polimerasa es una polimerasa termoestable y se hace el seguimiento de la reacción en tiempo real. A continuación puede realizarse un análisis de la curva de fusión.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona una solución novedosa y mejorada para realizar la reacción de extensión del cebador con mayor especificidad. En particular, la presente invención proporciona una solución nueva y mejorada de realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico con mayor especificidad. El efecto llamado "hot start" se traduce en la inhibición eficaz de las extensiones no deseadas del cebador. Las extensiones no deseadas del cebador son el resultado de acontecimientos accidentales de hibridación, en los que los cebadores se hibridan por lo menos parcialmente con cualquier secuencia de la muestra de ácido nucleico, que es diferente del sitio actual de fijación del ácido nucleico diana sobre el cebador.

Compuestos de la presente invención

30 La presente invención proporciona un compuesto químico que tiene la estructura:



caracterizada porque

35 $3 \leq m \leq 6,$
 $30 \leq n \leq 60$

cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1, cada X e Y tienen los significados definidos anteriormente, con la condición de que cada uno de m, x e y son se elija con independencia para cada unidad $[Xx - (CH_2)_m - \text{fosfato} - Yy]$ y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además con la condición de que el Y terminal pueda ser también -H o un grupo Cm - OH.

45 El compuesto de la invención se ha diseñado para actuar como reactivo reversible de fijación a los iones Mg^{2+} a temperaturas bajas. En cambio, el compuesto no parece que haya de tener una afinidad razonable de fijación sobre las polimerasas de DNA. Los ensayos realizados con el fin de determinar los grados de fijación de la polimerasa Taq sobre diversos compuestos inmovilizados que tienen una estructura según la presente invención en un instrumento BIAcore 2000 no han conseguido revelar ninguna afinidad de fijación específica detectable.

50 Cuando la temperatura se eleva, los iones Mg^{2+} se liberan otra vez a la solución. Se sabe acerca de las reacciones de extensión de cebadores catalizadas con polimerasa que la concentración de iones Mg^{2+} desempeña un papel crucial para la especificidad y facilidad de realización de estas reacciones. Por lo tanto, si al principio de una reacción en cadena de la polimerasa, los iones Mg^{2+} se han apartado de modo reversible de la solución mediante una unión no covalente con el compuesto de la invención, que está presente en la muestra, dependiente de la temperatura, entonces se consigue el efecto "hot start" deseado: se inhibe la actividad no deseada de la polimerasa a baja temperatura, en la que se basa la extensión de los cebadores, que se unen de modo inespecífico a regiones diana erróneas de la muestra de ácido nucleico. Con la liberación reversible de iones Mg^{2+} del compuesto de la invención, la concentración efectiva de iones Mg^{2+} vuelve a aumentar y puede tener lugar la extensión específica del cebador causada por la polimerasa.

60 Además, debido al hecho de que la unión entre el compuesto de la invención y el Mg^{2+} es reversible de modo dependiente de la temperatura, el efecto "hot start" deseado se consigue no solo antes del primer aumento de temperatura al principio de la reacción en cadena de la polimerasa, sino también durante cada fase de fusión de los ciclos posteriores a lo largo del protocolo completo de la amplificación.

65 Para cada unidad $[Xx - (CH_2)_m - \text{fosfato} - Yy]$, X e Y pueden estar ausentes o significar una entidad medible fotométricamente, ya definida anteriormente. Sin embargo, debido a razones de facilidad de síntesis, es preferible que

la mayoría o todas las unidades del compuesto de la invención sean idénticas. Además, si todas las unidades son idénticas, es ventajoso que dentro de cada unidad esté presente o bien solo X o bien solo Y.

5 Según la presente invención, el compuesto de la invención se compone de 30 a 60 unidades de este tipo. Se requieren por lo menos 30 unidades para conseguir el efecto "hot start" deseado, mientras que el límite superior de 60 unidades hace que el compuesto de la invención sea fácil de sintetizar por los métodos que se describen a continuación.

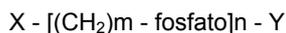
10 El compuesto de la invención lleva con preferencia una entidad X y/o Y medible fotométricamente para facilitar el ajuste de concentración mediante la espectroscopía UV o visible.

15 Estas entidades medibles fotométricamente con restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina o análogos de nucleótido, cuya presencia es detectable midiendo la correspondiente absorción UV a 260 nm.

20 Otros ejemplos de entidades medibles fotométricamente podrán elegirse entre el grupo formado por compuestos aromáticos, por ejemplo dinitrofenilo o fenilo, compuestos poliaromáticos, por ejemplo pirenos o heteroaromáticos, por ejemplo acridina y los colorantes fluorescentes y no fluorescentes, como son por ejemplo las fluoresceínas, rodaminas, oxazinas, cianinas o colorantes azoicos.

25 Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, X o Y con independencia entre sí pueden estar presentes o ausentes o ser un colorante o un nucleósido. En aquellos casos, en los que X o Y significan entidades internas del compuesto, dichos restos X e Y serán con preferencia restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina.

En una forma de ejecución, el compuesto tiene la estructura:



30 caracterizada porque

$$3 \leq m \leq 6, \\ 30 \leq n \leq 60$$

X es un grupo hidroxilo o fosfato e

35 Y es un grupo hidroxilo o una entidad medible fotométricamente, por ejemplo un resto (desoxi)nucleósido.

Con preferencia, todas las unidades $[(CH_2)_m - \text{fosfato}]$ son idénticas.

En otra forma de ejecución, el compuesto tiene la estructura:



caracterizada porque

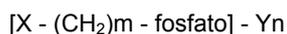
$$3 < m < 6, \\ 30 < n < 60$$

45 X es un grupo hidroxilo o fosfato y

cada Y es un grupo hidroxilo o una entidad medible fotométricamente, por ejemplo un resto (desoxi)nucleósido.

Con preferencia, todas las unidades $[(CH_2)_m - \text{fosfato} - Y]$ son idénticas.

50 En otra forma de ejecución, el compuesto tiene la estructura:



caracterizada porque

55
$$3 \leq m \leq 6, \\ 30 \leq n \leq 60$$

cada X es o una entidad medible fotométricamente, por ejemplo un resto (desoxi)nucleósido e

Y es un grupo hidroxilo.

60 Con preferencia, todas las unidades $[X - (CH_2)_m - \text{fosfato}]$ son idénticas.

65 El espaciado entre los grupos fosfato de las diferentes unidades dependerá del número de átomos de C en combinación con la presencia o ausencia de restos X e Y internos. Según la presente invención, el espaciado se elige de manera que permita efectivamente un tipo de unión compleja, es decir, una interacción no covalente entre un ion de Mg^{2+} y dos restos fosfato adyacentes, que están presentes en el compuesto de la invención.

El compuesto de la invención es un polianión, caracterizado de modo predominante por la unidad central $(\text{CH}_2)_m$ - fosfato, en la que m es un número entero entre 3 y 6, es decir, la unidad central consta de 3 a 6 átomos de C, que definen el límite inferior del espaciado mínimo entre dos restos fosfato adyacentes.

- 5 Además, se ha comprobado que es posible insertar más restos X e Y, que extienden la longitud de la cadena de átomos que conecta los restos fosfatos, ampliando a simple vista la distancia entre dichos restos. Sin embargo, tal como se demostrará en el ejemplo, la presencia de restos X e Y tiene un efecto negativo en la unión compleja de los iones Mg^{2+} . Ello se debe con gran probabilidad a la flexibilidad estérica del compuesto de la invención.
- 10 Los compuestos de la invención pueden sintetizarse aplicando la química estándar de las fosforamiditas, ya empleada en la técnica para la síntesis química de los oligonucleótidos. Más en concreto, la incorporación de unidades $[(\text{CH}_2)_m$ - fosfato] se logra mediante el uso de fosforamiditas engarzadas por un átomo de C provistas de un resto hidroxilo terminal protegido, que son productos comerciales. La incorporación de restos nucleósido como entidades medibles fotométricamente puede realizarse mediante el uso de fosforamiditas de nucleósido estándar, que son productos comerciales. Los compuestos de la invención pueden descomponerse por métodos estándar, resultando de ello un fosfato o un OH terminales o un resto nucleósido terminal.
- 15

Composiciones según la presente invención

- 20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que contiene
- un compuesto definido previamente
 - una polimerasa de DNA,
 - y desoxi-oligonucleósidos trifosfatos.
- 25 Tal composición es particularmente útil para la realización de una reacción de amplificación PCR, porque se evita la formación de productos artificiales de amplificación, como son los dímeros de cebador.
- 30 La concentración del compuesto de la invención se elige de tal manera que se optimicen la especificidad y el rendimiento de la reacción de amplificación PCR. Con preferencia, la concentración final del compuesto de la invención es inferior a 0,1 mM con el fin de evitar cualquier inhibición de la amplificación del ácido nucleico diana específico. La concentración final del compuesto de la invención se sitúa también con preferencia en 0,01 mM con el fin de lograr un efecto "hot start" sustancial.
- 35 La polimerasa de DNA puede ser en general cualquier enzima que sea capaz de realizar una reacción de extensión de cebador dependiente del molde. Dicha reacción de extensión de cebador dependiente del molde puede realizarse en todos los híbridos de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, caracterizado porque un ácido nucleico cebador con un grupo hidroxilo libre en el extremo 3' se hibrida con un ácido nucleico molde con un saledizo de hebra simple en el extremo 5'. La polimerasa dependiente de molde cataliza entonces la extensión del extremo 3' del cebador mediante la incorporación de restos nucleótido, que son siempre complementarios del nucleótido de la posición opuesta dentro de la hebra del molde. En la reacción se emplean dNTPs como sustratos y tiene como resultado la liberación de pirofosfato.
- 40
- 45 En una forma de ejecución, dicha polimerasa de DNA es un molde RNA dependiente de la polimerasa o cualquier modificación del mismo. Dichas enzimas se llaman habitualmente transcriptasas inversas. Son ejemplos de ello la transcriptasa inversa AMV o la transcriptasa inversa MMLV. En particular, la transcriptasa inversa Transcriptor (Roche Applied Science, nº de cat. 03 531 317 001) es una enzima aplicable en el contexto de la presente invención. Las composiciones de la invención que contienen dicha polimerasa de DNA dependiente de RNA son especialmente útiles para todo tipo de aplicaciones de síntesis de cDNA preparativa y analítica y en particular para la PCR-RT de 2
- 50 pasos.
- En otra forma de ejecución, la polimerasa de DNA es una polimerasa de DNA dependiente de molde DNA o cualquier mutante o modificación de la misma. Un ejemplo especial es la polimerasa de Klenow (Roche Applied Science, nº de cat. 11 008 404 001). La polimerasa de DNA es con preferencia una polimerasa de DNA termoestable o cualquier mutante o modificación de la misma. Un ejemplo típico es la polimerasa de DNA Taq del *Thermus aquaticus* (Roche Applied Science, nº de cat. 11 647 679 001). Las enzimas polimerasas de DNA dependientes de DNA pueden o no tener actividad de lectura de corrección 3'-5', como tiene la polimerasa Pwo (Roche Applied Science, nº de cat. 11 644 947 001). Además, el componente polimerasa de DNA de la presente invención puede ser una mezcla de enzimas, con y sin actividad de lectura de corrección, por ejemplo el sistema llamado Expand High Fidelity (Roche Applied Science, nº de cat. 11 732 641 001). Las composiciones de la invención que contienen cualquier tipo de polimerasa termoestable son específicamente útiles para realizar varias formas de ejecución preparativas o analíticas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 55
- 60
- 65 En otra forma de ejecución, el componente polimerasa de DNA de la presente invención es una polimerasa de DNA dependiente de DNA termoestable, que tiene actividad adicional de transcriptasa inversa dependiente del molde RNA, similar a la polimerasa del *Thermus thermophilus* (Roche Applied Science, nº de cat. 11 480 014 001) o una

mezcla de una polimerasa de DNA dependiente de RNA (es decir, una transcriptasa inversa) y una polimerasa de DNA dependiente de DNA termoestable. Las composiciones de la invención que contienen estos componentes son especialmente útiles para la realización analítica del PCR-RT de un paso.

- 5 Los desoxinucleótidos-trifosfatos (dNTPs) son normalmente una mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, sin embargo, en algunos casos específicos, solamente pueden utilizarse 3 o menos tipos diferentes de dNTP. Además, dicho dNTP puede modificarse químicamente por muchos métodos, en el supuesto de que el bloqueo estructural continúe siendo capaz de incorporarse a la cadena naciente del polinucleótido por acción de la polimerasa. Por ejemplo, dichos compuestos nucleótidos modificados pueden llevar una biotina o una modificación fluorescente del compuesto en el resto de la base correspondiente. Además, por lo menos un componente de la mezcla de dNTP puede estar parcial o totalmente sustituido por un análogo de dNTP, por ejemplo la 7-desaza-DGTP.

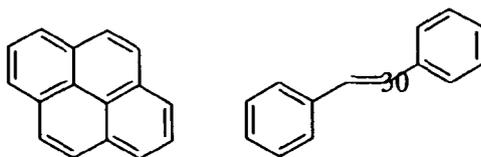
15 El cebador oligonucleótido, que será por lo menos uno, es normalmente un desoxi-oligonucleótido que es completamente o casi completamente complementario de la región específica del ácido nucleico diana. Además, dicho cebador ha de tener un grupo hidroxilo libre en el extremo 3', de modo que sea extensible por acción de una polimerasa de DNA. Para fines específicos, dicho cebador puede estar modificado químicamente, por ejemplo internamente o en su extremo 5'. Los ejemplos de modificaciones empleadas con frecuencia con los marcadores de biotina, los marcadores de digoxigenina y los marcadores fluorescentes. El cebador puede contener además nucleósidos o análogos de nucleósidos modificados, de los que se sabe que mejoran los resultados de la PCR, en las amplificaciones específicas de alelos, p.ej. bases modificadas en 4' o bases universales, por ejemplo la inosina, con el fin de amplificar diferentes alelos que pueden estar presentes en la misma muestra.

25 Si una polimerasa de DNA dependiente de DNA termoestable se diseña para una reacción PCR, entonces la composición según la presente invención contendrá normalmente dos oligonucleótidos cebadores que se hibridan en orientaciones opuestas a las hebras opuestas del ácido nucleico diana adyacente a la secuencia diana que se pretende amplificar. Es posible además que la composición de la presente invención contenga múltiples pares de cebadores de PCR oligonucleótidos PCR para una amplificación PCR multiplex.

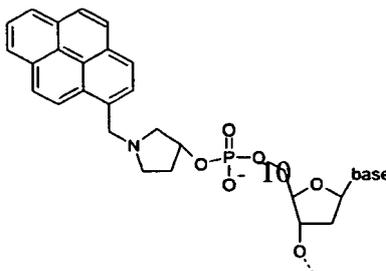
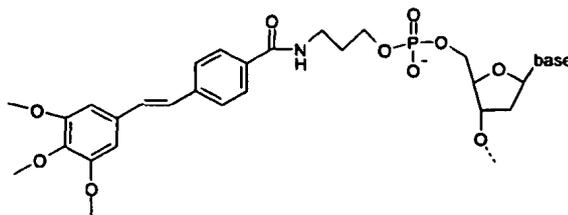
30 En una forma específica de ejecución, dicha composición contiene además un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizada porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo. Más exactamente, el término "oligonucleótido aleatorio" indica un grupo de oligonucleótidos, cuyas secuencias representan de modo más o menos igual todas las combinaciones posibles de los 4 restos nucleótido diferentes. Aunque la adición de 5-ámeros y la adición de 8-ámeros se ha demostrado que tiene el efecto "hot start" deseado, se ha constatado que es especialmente ventajoso si se emplean oligonucleótidos hexámeros aleatorios. Dichos oligonucleótidos aleatorios pueden añadirse a la reacción de extensión del cebador o a la reacción PCR en un intervalo de concentraciones comprendido entre 10 μ M y 1 mM, con preferencia entre 25 μ M y 400 μ M y con preferencia especial en una concentración en torno a 100 μ M. Se ha demostrado además que es especialmente ventajoso que los oligonucleótidos aleatorios tengan un extremo 3' no extensible, que puede bloquearse por ejemplo con un resto fosfato. Esto evita el alargamiento no deseado por acción de la polimerasa en el caso de una hibridación accidental de cualquiera de los oligonucleótidos de cualquier región del ácido nucleico de la muestra.

45 Los oligonucleótidos aleatorios se modifican químicamente con un resto orgánico hidrófobo. Dichos restos normalmente no interfieren con las reacciones de extensión del cebador. Por ejemplo, se puede elegir un resto orgánico hidrófobo entre un grupo de restos formado por anillos aromáticos y heteroaromáticos policondensados, por ejemplo naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, antraquinonas, carbazolfenantrolinas, quinolinas, etc., o entre los estilbenos o entre los esteroides, por ejemplo el colesterol. Dichos restos hidrófobos pueden sustituirse por sustituyentes no voluminosos, por ejemplo el ciano, metoxi, metilo, nitro y halógenos y en algunos casos se sabe que actúan como "tapones" que estabilizan los pares de bases terminales; Narayanan, S. y col., *Nucleic Acids Research* 32(9), 2901-2911, 2004; Dogan, Z. y col., *Journal of the American Chemical Society* 126(15), 4762-4763, 2004.

50 Con preferencia especial, dicho resto orgánico hidrófobo es un pireno opcionalmente sustituido o un estilbeno opcionalmente sustituido que tienen las estructuras químicas siguientes:



55 Con preferencia especial, dicho pireno o estilbeno está unido al extremo 5' de un oligonucleótido aleatorio, mientras que el extremo 5' de dicho oligonucleótido tiene la estructura siguiente:



5 El resto orgánico hidrófobo puede estar ubicado en cualquier parte del oligonucleótido aleatorio. Sin embargo, con preferencia dicha modificación se introduce en el extremo 5' del oligonucleótido aleatorio. El motivo está en que la modificación 5' puede introducirse en el oligonucleótido aplicando la química de la fosforamidita con una fosforamidita terminal apropiada, con arreglo a los métodos estándar, que los expertos conocen bien y las fosforamiditas de pireno y de estilbeno son productos comerciales.

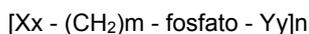
10 El oligonucleótido aleatorio podría contener análogos de nucleobases que tuvieran bases modificadas, por ejemplo los análogos de 7-desaza, por ejemplo la 7-desaza-dG, análogos de 7-desaza-8-aza, por ejemplo la 7-bromo-7-desaza-8-aza-2-amino-dA, o bases sustituidas, por ejemplo el propinilo U, propinilo C, o análogos con azúcares modificados, por ejemplo la 2'-metoxi-ribosa o azúcares bloqueados, como en LNA, o con análogos de ribosa, por ejemplo el hexitol y el altritol. En lugar de las bases universales aleatorias, por ejemplo el nitroindol o N8 se emplean las 7-desaza-8-aza-dA ribosiladas, mientras que se emplea con preferencia solamente en una posición del elemento aleatorio (randomer) una base en lugar de elementos aleatorios. El fosfato internucleosídico puede estar sustituido por un sucedáneo de fosfato, por ejemplo un fosforotioato o un metilfosfonato o un fosforamidato. El oligonucleótido aleatorio tiene con preferencia un resto hidrófobo, pero además puede estar sustituido por otros restos hidrófobos, mientras que los restos hidrófobos se eligen con independencia entre sí.

25 Resumiendo, las composiciones que contienen los compuestos polianiones de la invención definidos anteriormente en combinación con una polimerasa de DNA dependiente de DNA termoestable y por lo menos un par de cebadores de amplificación son especialmente útiles para efectuar una reacción de amplificación PCR. La razón es que la presencia de dichos polianiones inhibe eficazmente la formación de productos artificiales de amplificación, catalizada por la polimerasa, como son los dímeros de cebador, a temperaturas inferiores a la temperatura de fusión de los correspondientes cebadores de amplificación, generando de este modo un efecto "hot start".

30 Está también dentro del alcance de la presente invención que cualquiera de las composiciones definidas anteriormente contenga una muestra de ácido nucleico diana. La muestra puede contener en general por ejemplo DNA genómico o fragmentos de DNA genómico junto con polimerasas de DNA dependientes de DNA o RNA celular total o RNA poli-A+ en combinación con polimerasas de DNA dependientes de RNA.

35 Kits según la presente invención

En un aspecto especial, la presente invención proporciona también kits para fabricar composiciones descritas con detalle en páginas anteriores. Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un kit que contiene por lo menos una polimerasa de DNA y un compuesto que tiene la estructura:



caracterizada porque

$$3 \leq m \leq 6,$$

$$30 \leq n \leq 60$$

45 cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1, cada X e Y con independencia entre sí tienen los significados definidos anteriormente,

con la condición de que cada uno de m, x e y se elija con independencia para cada unidad [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy] y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además con la condición de que el Y terminal pueda ser también -H o un grupo (CH₂)_m - OH.

- 5 Con preferencia, las entidades medibles fotométricamente son por ejemplo son restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina o análogos de nucleósido, cuya presencia es detectable por la correspondiente medición de la absorción UV a 260 nm. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, X e Y con independencia entre sí pueden estar ausentes o ser nucleósidos. En aquellos casos, en los que X o Y signifiquen entidades internas del compuesto, dichos restos X e Y serán con preferencia restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina.

15 El kit puede contener además otros componentes, por ejemplo desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y tampones apropiados, así como otros aditivos reactivos, que son útiles para realizar las correspondientes reacciones de extensión del cebador. Por otro lado, los kits específicos de parámetros pueden contener por lo menos un oligonucleótido específico del cebador diana.

20 Además, el kit puede contener un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizado porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo ya descrita previamente. En particular, dicho resto hidrófobo puede ser el pireno.

25 En una primera forma específica de ejecución, el kit se diseña para la síntesis del cDNA y contiene una transcriptasa inversa ya definida previamente. Como componente cebador, el kit puede contener un cebador específico de parámetro para la amplificación de cDNAs específicos.

30 En una segunda forma específica de ejecución, el kit se diseña para realizar una PCR y contiene una polimerasa termoestable dependiente del DNA o una mezcla de polimerasas termoestables dependientes del DNA. El kit puede contener entonces por ejemplo dNTPs y/o una solución tampón y/o por lo menos uno o múltiples pares de cebadores de amplificación. Más específicamente, si el kit se diseña para una PCR-RT de un paso, el componente enzima podrá ser una polimerasa termoestable dependiente del DNA que tenga además actividad de transcriptasa inversa.

35 En una tercera forma específica de ejecución, el kit se diseña para una PCR-RT de 2 pasos y puede contener varias combinaciones de componentes elegidos entre los componentes de la primera y la segunda forma de ejecución definidas antes.

40 Además, los kits de la segunda y tercera formas de ejecución específicas pueden contener componentes útiles para la detección de los productos de la amplificación PCR. Por ejemplo, si el kit se diseña para una PCR en tiempo real (= qPCR), dicho kit podrá contener además un componentes colorantes que se una a un DNA de doble hebra, por ejemplo el verde llamado SybrGreen (Roche Applied Science, nº de cat. 04 707 516 001) o el colorante LC480 ResoLight (Roche Applied Science, nº de cat. 04 909 640 001). Como alternativa, este kit puede contener además sondas de hibridación marcadas con marcadores fluorescentes, por ejemplo sondas TaqMan (US 5,804,375), antorchas moleculares (US 5,118,801), sondas de hibridación FRET (US 6,174,670) o sondas simples (WO 02/14555).

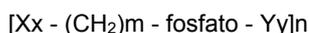
45 Métodos de la presente invención

La presente invención se refiere no solo a composiciones y kits, sino también a métodos para realizar reacciones de extensión de cebador en general y reacciones PCR o de transcripción inversa en particular. Por lo tanto, en su sentido más amplio, un método según la presente invención consta de los pasos siguientes:

- 50 - proporcionar una muestra, de la que se supone que contiene un ácido nucleico diana,
- añadir una cualquiera de las composiciones definidas anteriormente y
- realizar por lo menos la primera reacción de extensión del cebador.

Más precisamente, un método según la presente invención consta de los pasos siguientes:

- 55 - aportar una mezcla, de la que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana,
- añadir
- una polimerasa de DNA
- desoxinucleótidos
60 - por lo menos un oligonucleótido cebador y
- un compuesto químico que tiene la estructura:



65 caracterizada porque

$$3 \leq m \leq 6,$$

10

$$30 \leq n \leq 60$$

cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1,
 cada X e Y con independencia entre sí tienen los significados definidos anteriormente,
 con la condición de que cada uno de m, x e y se elija con independencia para cada unidad [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy] y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además con la condición de que el Y terminal pueda ser también -H o un grupo (CH₂)_m - OH.

- realizar por lo menos una primera reacción de extensión del cebador.

10 Con preferencia, las entidades medibles fotométricamente son por ejemplo son restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina o análogos de nucleósido, cuya presencia es detectable por la correspondiente medición de la absorción UV a 260 nm. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, X e Y con independencia entre sí pueden estar ausentes o ser nucleósidos. En aquellos casos, en los que X o Y signifiquen entidades internas del compuesto, dichos restos X e Y serán con preferencia restos (desoxi)nucleósido, por ejemplo desoxi-adenosina, desoxi-guanosina, desoxi-citosina, desoxi-timidina o desoxi-uridina.

20 La concentración del compuesto químico se elige de modo que se optimicen la especificidad y el rendimiento de la reacción de amplificación PCR. Con preferencia, la concentración final del compuesto de la invención es inferior a 0,1 mM con el fin de evitar cualquier inhibición de la amplificación del ácido nucleico diana específico. Además con preferencia, la concentración final del compuesto de la invención es superior a 0,01 mM con el fin de lograr un efecto "hot start" sustancial.

25 En una primera forma de ejecución, la muestra es RNA total o RNA poli-A+, la polimerasa de DNA es una transcriptasa inversa y el oligonucleótido cebador es un cebador específico complementario del tipo específico de cDNA.

30 En una segunda forma de ejecución, la muestra se deriva de DNA genómico, la polimerasa de DNA es una polimerasa de DNA termoestable o una mezcla de polimerasas de DNA termoestables y se añaden por lo menos un par o múltiples pares de cebadores de amplificación antes de la reacción de amplificación PCR. Con preferencia, dicha reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción en cadena de la polimerasa, de la que se hace un seguimiento en tiempo real según métodos estándar ya conocidos de la técnica (véase, por ejemplo US 5,210,015, US 5,338,848, US 5,487,972, WO 97/46707, WO 97/46712, WO 97/46714).

35 En una forma particular de ejecución se somete el producto de amplificación generado a un análisis de curva de fusión (US 6,174,670, US 6,569,627), que consiste en someter el producto de la amplificación a un gradiente térmico a lo largo del tiempo. En este tipo de ensayo, se hace el seguimiento de la intensidad de la fluorescencia que se debe a la fijación de la sonda de hibridación marcada oportunamente o se debe a la fluorescencia originada por un colorante que se fija sobre el DNA. A continuación se traza una gráfica de la primera derivada de la disminución de la intensidad de fluorescencia debida a la fusión de la sonda de hibridación y de dos hebras de amplicón, respectivamente, frente al gradiente de temperatura.

45 Resumiendo, puede concluirse que el método de la invención contiene varias ventajas respecto a métodos ya publicados en la técnica. La presencia de un compuesto según la presente invención durante una reacción de extensión del cebador, por ejemplo una transcripción inversa o una PCR o una PCR-RT, se traduce claramente en un aumento de la especificidad de la reacción en cuestión.

50 Una ventaja principal del método de la invención es la facilidad de uso y el corto período de activación para eliminar la inhibición de la polimerasa a temperaturas bajas. Sencillamente se tiene que añadir a la reacción PCR un compuesto químico que tiene la estructura: [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy]_n, caracterizada porque $3 \leq m \leq 6$, $30 \leq n \leq 60$, cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1, cada X e Y con independencia entre sí tienen los significados definidos anteriormente, con la condición de que cada uno de m, x e y se elija con independencia para cada unidad [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy] y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además con la condición de que el Y terminal pueda ser también -OH. Con el fin de seguir optimizando el efecto "hot start" deseado se puede añadir opcionalmente un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, que contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo.

60 Durante el termociclado PCR, el período de desnaturalización antes de cada ciclo, que se requiere habitualmente para separar los moldes de DNA de doble hebra en hebras simples, es suficiente para disociar los iones Mg²⁺ del compuesto de la invención. De este modo se inhibe la elongación inespecífica del cebado no solo antes del inicio de la reacción PCR, sino también a lo largo de todo el proceso de termociclado.

Además, dichos compuestos de la invención pueden sintetizarse con arreglo a los métodos estándar de la química de los fosforamidatos, que están ya bien consolidados en la técnica. Los engarces fosforamiditas así como los restos nucleósido pueden introducirse durante la síntesis del compuesto de la invención con una flexibilidad ilimitada. Por lo

tanto, los costes de producción de los aditivos PCR de la invención son claramente inferiores a los costes de otras soluciones "hot start".

- 5 Además, los métodos, las composiciones y los kits de la invención pueden utilizarse en general para cualquier tipo de extensión de cebador, transcripción inversa o amplificación PCR, con independencia de la secuencia específica del ácido nucleico diana que se pretenda sintetizar, amplificar, detectar o analizar.

Descripción de las figuras

10 Figura 1

Amplificación PCR de diversas cantidades de DNA diana en presencia de diversas cantidades del compuesto X40 (ejemplo 2)

- 15 pistas de 1 a 6: reacción de control en ausencia de aditivo, con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.
 pistas de 7 a 12: reacción PCR en presencia de X40 (0,3 mM) con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.
 20 pistas de 13 a 18: reacción PCR en presencia de X40 (0,15 mM) con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.
 pistas de 19 a 24: reacción PCR en presencia de X40 (0,075 mM) con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.
 pistas de 25 a 30: reacción PCR en presencia de X40 (0,0375 mM) con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.
 25 pistas de 31 a 36: reacción PCR en presencia de X40 (0,018 mM) con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0 ng de DNA molde, respectivamente.

Figura 2

30 Análisis de curva de fusión después de la PCR-RT (ejemplo 5)

- a: síntesis de cDNA de primera hebra en presencia de X40 y posterior PCR en ausencia de X40,
 b: síntesis de cDNA de primera hebra en presencia de X40 y posterior PCR en presencia de X40,
 35 c: síntesis de cDNA de primera hebra en ausencia de X40 y posterior PCR en ausencia de X40,
 d: síntesis de cDNA de primera hebra en ausencia de X40 y posterior PCR en presencia de X40.

Ejemplos

Ejemplo 1

40

Síntesis de 3 compuestos según la presente invención

compuesto X40: un compuesto que contiene 8 unidades [C₃-fosfato]₅, cada unidad está interrumpida por un nucleósido timidina, con restos timidina adicionales en ambos extremos.

45

compuesto X30: un compuesto que contiene 6 unidades [C₃-fosfato]₅, cada unidad está interrumpida por un nucleósido timidina, con restos timidina adicionales en ambos extremos.

50

compuesto X20: un compuesto que contiene 4 unidades [C₃-fosfato]₅, cada unidad está interrumpida por un nucleósido timidina, con restos timidina adicionales en ambos extremos (no incluidos dentro del alcance de la invención reivindicada).

55

La síntesis se lleva a cabo de modo similar a la síntesis de oligonucleótidos en una escala 10 μmolar 4 veces en un sintetizador ABI 394. Todos los productos químicos para la síntesis estándar se adquieren a la empresa Glen Research. Se emplea la dT-CPG, que es un producto comercial, como soporte material dT-fosforamidita (5'-dimetoxitritil-2'-desoxi-timidina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita) y la fosforamidita espaciadora C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita) para la síntesis en fase sólida.

60

Para esta síntesis se aplica el método estándar de síntesis de oligonucleótido. Se despegua el producto del soporte a temperatura ambiente durante 2 h con una solución conc. de amoníaco en agua. Se purifica el producto oligo en bruto por cromatografía IEX en una columna MonoQ. Cromatografía: tampón A: 10 mM NaOH en agua, tampón B: 10 mM NaOH, 1 M NaCl en agua. Se mide la absorción UV del eluyente a 260 nm. Se obtiene una fracción principal que contiene el producto de longitud total deseado. Se separa la sal por diálisis y se elimina el disolvente en un evaporador rotatorio. Se ajusta la concentración midiendo la absorción a 260 nm (se calcula el coeficiente de extinción con un programa estándar).

65

Ejemplo 2

PCR en presencia de diversas concentraciones de X40

- 5 Se analizan diversas concentraciones de X40 en la PCR. Se efectúan las reacciones PCR en presencia o ausencia de X40 en un volumen de 50 µl que contienen 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng o 1 ng de DNA genómico humano, 30 mM Tris-HCl, de pH 8,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM cebador (SEQ ID NO 1: CTG AGA ATC GGC AAG AGA CC y SEQ ID NO 2: CTG CAC AGT AAT GCA TGC CG), 0,2 mM DE desoxinucleótidos y 2,5 unidades de polimerasa de DNA Taq. Se amplifica el DNA con las siguientes condiciones de ciclo: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, fusión a 62°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 60 segundos. Se separan los productos de amplificación a través de gel de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio. Se recogen los resultados en la figura 1. La reacción de control se efectúa en ausencia de aditivos y presenta una formación creciente de dímeros de cebador así como concentraciones decrecientes del DNA diana. En presencia de concentraciones inferiores a 0,1 mM de X40, se inhibe la síntesis del DNA. Con concentraciones inferiores a 0,1 mM o concentraciones bajas de X40 se reduce en gran manera la formación de dímeros del cebador.

Ejemplo 3

- 20 PCR en tiempo real, en presencia de X40, X30 y X20.

- Se analizan el X40, X30 y X20 en una PCR en tiempo real. Se llevan a cabo las reacciones PCR en presencia de X40 (concentración final: 40 µM o 70 µM), X30 (concentración final: 70 µM o 100 µM), X20 (varias concentraciones entre 40 y 100 µM) o en ausencia de aditivos. Las mezclas reaccionante contienen en cada caso 30 ng, 3 ng o 0,3 ng de DNA genómico humano, 50 mM Tris-HCl, de pH 8,6, 0,2 mM CHAPS, 1 mM BigChap, 20 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 µM cebador (SEQ ID NO 3: GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT y SEQ ID NO 4: GAA TCT CCA TTC ATT CTC AAA AGG ACT), 0,2 mM desoxinucleótidos, colorante SYBR Green 1:20 000 (sondas moleculares) y 2,4 unidades de polimerasa de DNA Taq. Se lleva a cabo la PCR en volúmenes de 20 µl en un instrumento LightCycler® 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05 015 278 001) con las siguientes condiciones de ciclo: desnaturalización a 95°C durante 2 min y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo, fusión a 65°C durante 5 segundos y elongación a 72°C durante 15 segundos. Se mide el perfil de fusión con arreglo a las instrucciones del fabricante, del modo siguiente: 95°C durante 1 segundo, 60°C durante 30 segundos y calentamiento continuo a 95°C a razón de 5 capturas/grado centígrado. Se efectúa la detección de la PCR en tiempo real aplicando el modo SybrGreen.
- 35 El análisis de la curva de fusión pone de manifiesto que, en ausencia de aditivos, se forma un segundo producto de temperatura de fusión más baja. En presencia del X40 o X30 se reduce la formación del producto inespecífico, mientras que la presencia del X20 (que no se incluye dentro del alcance de la presente invención) no se traduce en una reducción de la formación de producto inespecífico.

Ejemplo 4

Combinación de X40 con hexámeros tapados con pireno como aditivos de la PCR-RT

- 45 Se comprueba el efecto del X40 en combinación con hexámeros tapados con pireno en una PCR-RT de un paso en tiempo real con un par de cebadores, que aparte del producto específico provoca la aparición de una serie de productos inespecíficos.

- La mezcla de reacción está formada por 0,5 µM de cebadores en cada caso (SEQ ID NO 5: CCC TCT TCA CCC TGG CTA A y SEQ ID NO 6: ACC CTC TTC ACC CTG GCT A), 0,2 µM dATP, 0,2 µM dCTP, 0,2 µM dGTP, 0,6 µM dUTP, 30 mM Tris-HCl, de pH 8,5, 30 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, 0,01 % Tween, SYBR Green 1:20 000, 1,2 U de polimerasa de DNA Taq y 0,6 unidades de transcriptasa inversa Transcriptor (Roche Applied Science, nº de cat 04 379 012 001). Se añade el X40 en una concentración de 75 µM. Una mezcla de ensayo con la combinación de aditivos contiene 40 µM X40 y 40 µM hexámero tapado con pireno. Se emplea como molde el RNA total de células HeLa en una cantidad de 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg, respectivamente. Se emplea agua como molde de control. Se lleva a cabo la PCR-RT en un volumen de 20 µl en un instrumento LightCycler® 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05 015 278 001) con las siguientes condiciones de ciclo: transcripción inversa a 50°C durante 10 min, PCR con desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, fusión a 57°C durante 10 segundos y elongación a 72°C durante 13 segundos. Se mide el perfil de fusión con arreglo a las instrucciones del fabricante, del modo siguiente: 95°C durante 1 segundo, 40°C durante 10 segundos y calentamiento continuo a 95°C a razón de 5 capturas/grado centígrado.

- En ausencia de aditivos se generan muchos productos inespecíficos de amplificación PCR. En presencia de X40 se reduce significativamente el número de productos, mientras que con la combinación de X40 y hexámeros tapados con pireno se forma solamente un único producto específico de amplificación.

65

Ejemplo 5

PCR-RT en tiempo real

- 5 Con el fin de evaluar si el aumento de la especificidad puede observarse también en la síntesis de cDNA antes del paso de amplificación PCR, se efectúa un ensayo de PCR-RT de dos pasos con condiciones de reacción muy similares a las de la PCR-RT de un paso. Se efectúa cuatro reacciones en paralelo:
- 10 (a) síntesis del cDNA de primera hebra con X40 y posterior PCR en ausencia de X40,
 (b) síntesis del cDNA de primera hebra en presencia de X40 y posterior PCR en presencia de X40,
 (c) síntesis del cDNA de primera hebra en ausencia de X40 y posterior PCR en ausencia de X40,
 (d) síntesis del cDNA de primera hebra en ausencia de X40 y posterior PCR en presencia de X40.

15 Se eligen el G6PDH directo (forw) (SEQ ID NO 7: GCA AAC AGA GTG AGC CCT TC) y G6PDH inverso (rev) (SEQ ID NO 8: GGG CAA AGA AGT CCT CCA G) como par de cebadores que causa la formación de productos inespecíficos cuando están presentes cantidades bajas de RNA en la reacción PCR-RT. Se sintetiza el cDNA en reacciones de 20 µl que contienen 0,5 µM de cebadores, 0,6 unidades de Transcriptor (Roche Applied Sciences, nº de cat. 03531317001), 30 mM Tris.HCl, pH 8,6; 3 mM MgCl₂, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 600 µM dUTP, 20 mM KCl, 0,2 mM CHAPSO, 1 mM BigChap, 125 ng/ml de proteína de gen 32 de T4, SYBR Green en una dilución final de 1:20 000 y 10 pg de RNA total de células HeLa. Se preparan dos muestras para la síntesis del cDNA, una con 100 µM X40, la otra sin X40. Se incuban las mezclas reaccionantes a 50°C durante 10 min, a 95°C durante 2 min y se enfrían sobre hielo. Después se dividen las dos reacciones y después se efectúa la PCR en volúmenes de reacción de 20 µl empleando 2 µl de las mezclas de reacción de cDNA, 0,5 µM de los cebadores, 1,2 unidades de la polimerasa Taq en el mismo tampón, del modo descrito para la mezcla reaccionante de cDNA en presencia o ausencia de una concentración final adicional de 100 µM de X40. Se incuban las cuatro mezclas reaccionantes diferentes en un instrumento LightCycler 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05 015 278 001) a 95°C durante 2 min y 45 ciclos de 95°C/10 segundos, 60°C/10 segundos, 72°C/13 segundos. Se determinan los perfiles de fusión de los productos de amplificación con arreglo a las instrucciones del fabricante, que se representan en las figuras 2 a-d. En las reacciones, en las que está presente el X40 durante la síntesis del cDNA y posterior PCR (figura 2b) solamente se forma un pico de fusión, que representa un producto único, que tiene el punto de fusión esperado. Si la síntesis del cDNA se realiza en ausencia del X40 durante la PCR (fig. 2c y 2d), entonces se generan varios productos, que tienen temperaturas de fusión diferentes de la del producto específico. Incluso la presencia del X40 durante la síntesis del cDNA, pero con ausencia durante la posterior amplificación (fig. 2a), permite obtener un mejor resultado que la ausencia total del X40. Por lo tanto, este resultado indica que el X40 es capaz de suprimir la formación de productos inespecíficos durante la amplificación PCR del DNA así como durante la transcripción inversa del RNA.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 40 Roche Diagnostics GmbH
 <120> Polianión para la amplificación mejorada de ácidos nucleicos
 <130> 25350 EP1
 <150> 08015812
 <151> 2008-09-09
 45 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA de hebra simple, cebador
 <400> 1
 ctgagaatcg gcaagagacc 20
 55 <210> 2
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA de hebra simple, cebador
 5 <400> 2
 ctgcacagta atgcatgccg 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA de hebra simple, cebador
 <400> 3
 ggaagtacag ctcagagttc t 21
 15 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> DNA de hebra simple, cebador
 <400> 4
 gaatctccat tcattctcaa aaggact 27
 <210> 5
 <211> 19
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> DNA de hebra simple, cebador
 <400> 5
 30 ccctcttcac cctggctaa 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> DNA de hebra simple, cebador
 <400> 6
 accctcttca ccctggcta 19
 <210> 7
 40 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> DNA de hebra simple, cebador

<400> 7

gcaaacagag tgagcccttc 20

5 <210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> DNA de hebra simple, cebador

<400> 8

gggcaaagaa gtcctccag 19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:

5 [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy]_n

caracterizado porque

$$3 \leq m \leq 6,$$

$$30 \leq n \leq 60$$

10 cada x e y con independencia entre sí son el número 0 ó 1,
 cada X e Y con independencia entre sí son una entidad elegida entre el grupo formado por restos nucleósido, restos (desoxi)nucleósido y análogos de nucleósido o de (desoxi)nucleósido,
 con la condición de que cada uno de m, x e y se elija con independencia para cada unidad [Xx - (CH₂)_m - fosfato - Yy] y además con la condición de que el X terminal pueda ser también un grupo -OH o un grupo fosfato y además
 15 con la condición de que el Y terminal pueda ser también -H o un grupo (CH₂)_m - OH.

2. Una composición que contiene

20 - un compuesto según la reivindicación 1,
 - una polimerasa de DNA,
 - y desoxi-oligonucleótidos.

3. Una composición según la reivindicación 2 que contiene además un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizada porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo.

25

4. Un kit que contiene:

30 - un compuesto o composición según las reivindicaciones 2-3,
 - una polimerasa de DNA,
 - y desoxi-oligonucleótidos.

5. Un kit según la reivindicación 4, que contiene además un oligonucleótido 5-8-ámero aleatorio, caracterizado porque dicho oligonucleótido contiene una modificación con un resto orgánico hidrófobo.

35

6. Un método que consta de los pasos siguientes:

40 - aportar una muestra que contenga un ácido nucleico,
 - proporcionar una composición según la reivindicación 3,
 - proporcionar por lo menos un primer oligonucleótido cebador,
 - efectuar una reacción de extensión de cebador catalizada por una polimerasa.

7. Un método según la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico es un RNA y dicha polimerasa de DNA tiene actividad de transcriptasa inversa.

45

8. Un método según las reivindicaciones 6-7, en el que dicha polimerasa es una polimerasa termoestable y se hace el seguimiento de la reacción en tiempo real.

9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque el producto que se genera en dicha amplificación se somete a un análisis de curva de fusión.

50

Fig. 1

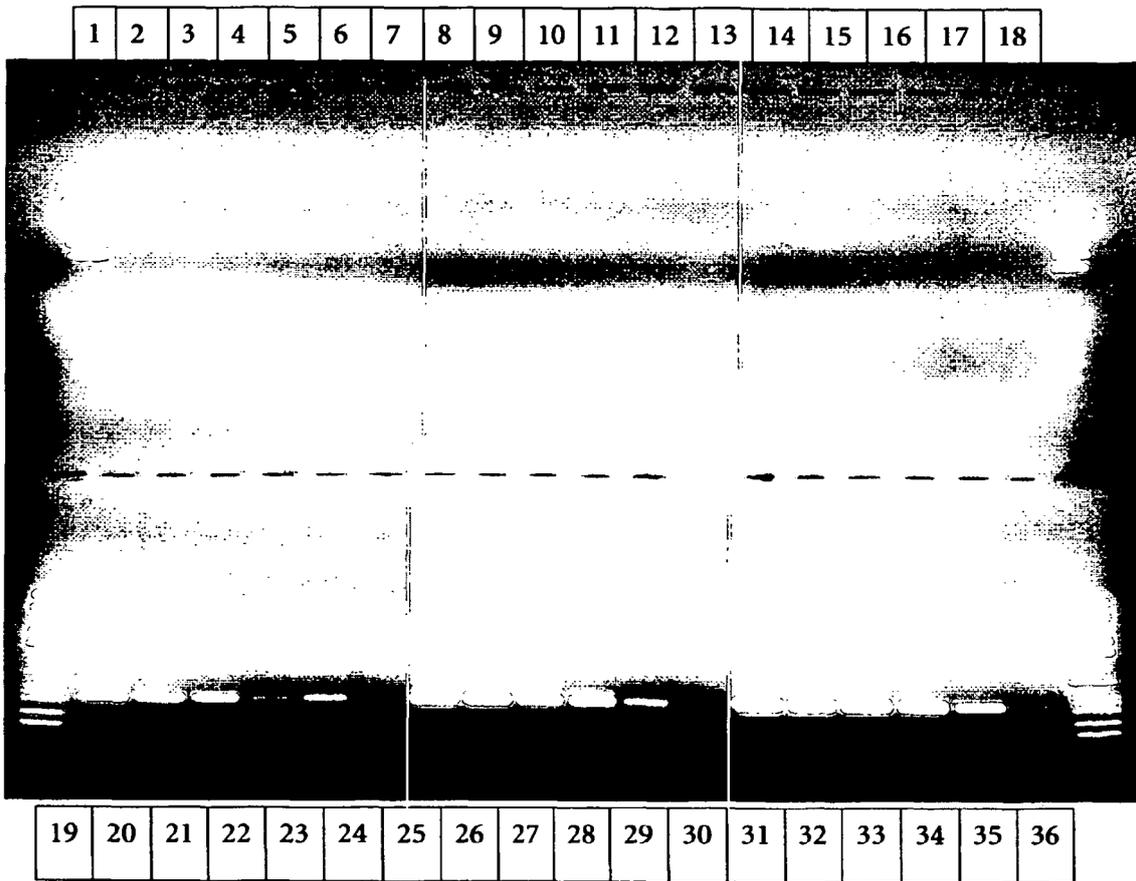


Fig. 2A

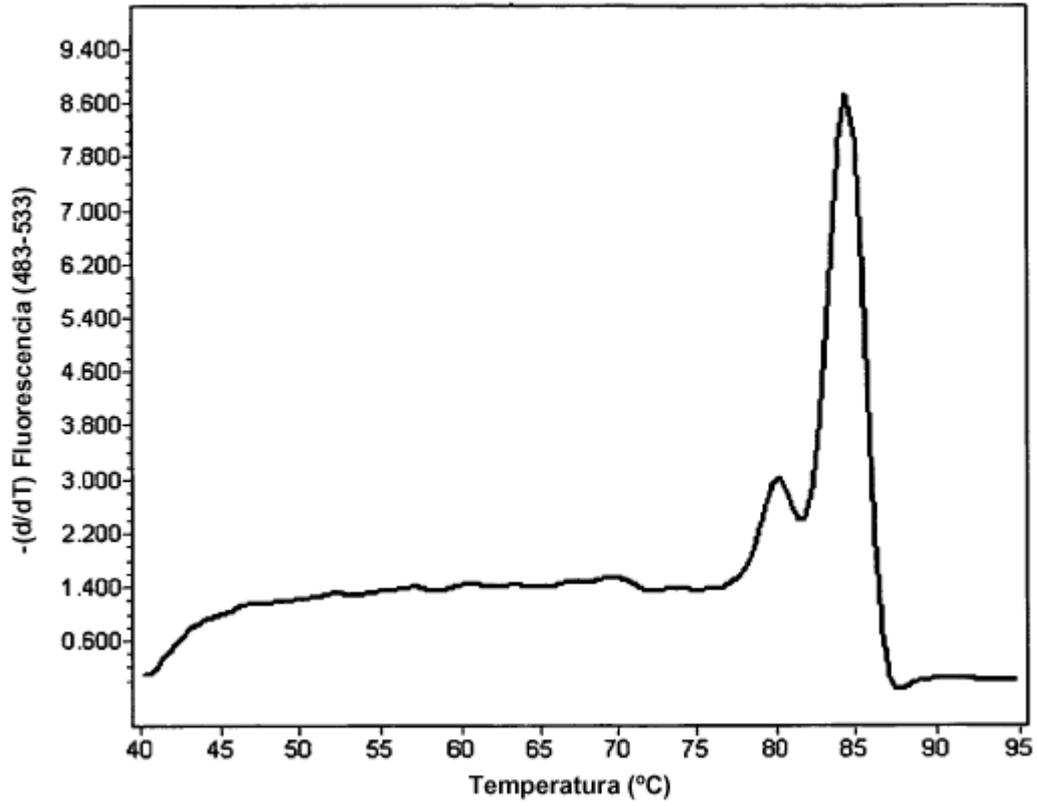


Fig. 2B

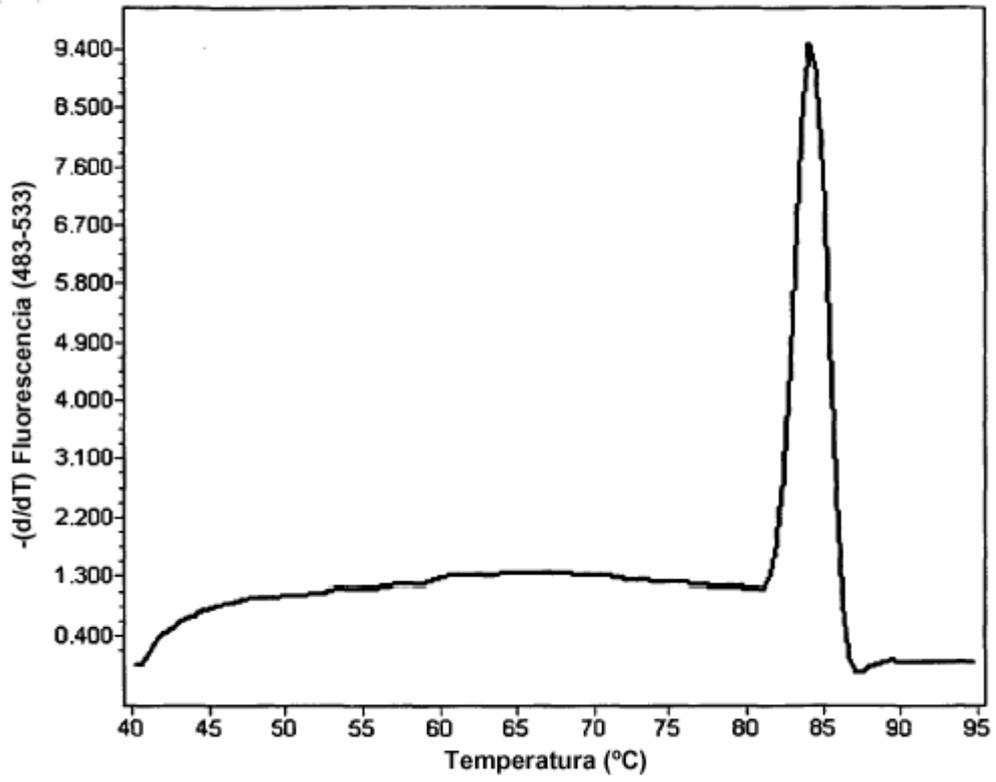


Fig. 2C

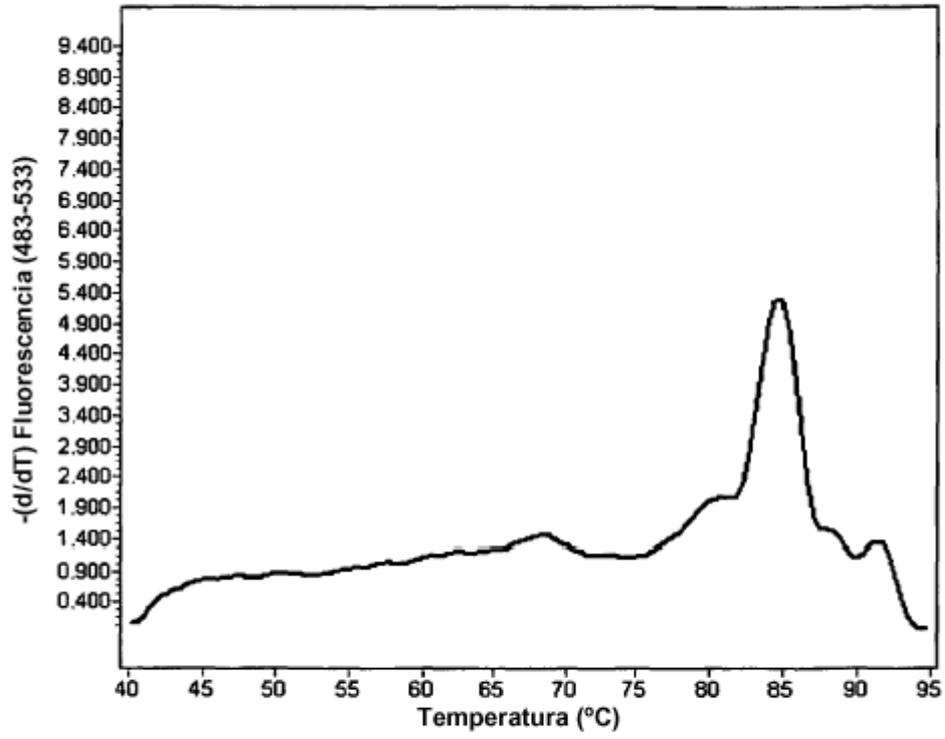


Fig. 2D