

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 202**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07836334 .8**
96 Fecha de presentación: **30.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2049689**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS USANDO UN OLIGONUCLEÓTIDO MODIFICADO REVERSIBLEMENTE.**

30 Prioridad:
31.07.2006 US 834410 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2012

73 Titular/es:
**WANLI BI
402 REGAL LILY LANE
SAN RAMON CA 94582, US**

72 Inventor/es:
Bi, Wanli

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 376 202 T3

DESCRIPCIÓN

Amplificación de ácidos nucleicos usando un oligonucleótido modificado reversiblemente.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere en general al campo de la química de ácidos nucleicos. Más específicamente, se refiere a métodos para amplificar secuencias o señales de ácidos nucleicos y a métodos para reducir la amplificación no específica.

ANTECEDENTES

10 Las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos se usan ampliamente en microbiología clínica, cribado de sangre, seguridad alimentaria, diagnóstico y pronóstico de enfermedades genéticas, microbiología medioambiental, descubrimiento y validación de fármacos diana, medicina forense y otras investigaciones biomédicas. La robustez, especificidad, sensibilidad, fiabilidad, en términos de exactitud y precisión, y asequibilidad de la amplificación de los ácidos nucleicos tienen una importancia particular.

15 La amplificación específica de secuencias de ácidos nucleicos permite la detección sensible de la presencia de una secuencia específica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) son dos tecnologías de amplificación de termociclado.

20 A diferencia de PCR y LCR, la amplificación isotérmica se refiere a una categoría de amplificación en la que la amplificación se realiza a una temperatura sustancialmente constante. La amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación con círculo rodante (RCA), amplificación isotérmica con un único cebador (SPIA™) y amplificación isotérmica con un único cebador exponencial (X-SPIA™), replicación de secuencia auto-sostenible (3SR) y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) son ejemplos de amplificación isotérmica. La secuencia de ácido nucleico también puede detectarse mediante un proceso de amplificación de la señal, tal como sonda cíclica o ensayo invasor. La señal detectable se genera por la escisión con nucleasa de la sonda hibridada.

25 Como todas las enzimas, independientemente de su termoestabilidad, son activas en un intervalo de temperatura, dicha propiedad podría afectar de manera adversa la amplificación del ácido nucleico en términos de especificidad, sensibilidad y relación señal/ruido etc. Esto se ha demostrado claramente en el proceso de PCR. Una ADN polimerasa termoestable es esencial para una PCR. Aunque la temperatura óptima de la actividad catalítica de una ADN polimerasa termoestable es alrededor de 60~75°C, también es activa a temperatura baja. Retiene una actividad significativa incluso a temperatura ambiente. Su actividad a temperatura baja es una causa de la formación de dímeros de cebador, amplificación no específica y sensibilidad reducida de la detección.

30 El rendimiento de la PCR de ADN se mejora empleando tecnologías de arranque en caliente. "Arranque en caliente" se refiere a cualquier método para ensamblar reacciones de PCR que mantiene uno o más de los componentes de la reacción físicamente o funcionalmente separados del resto de los componentes a temperatura baja y que permite el inicio de las reacciones a una temperatura elevada. Las tecnologías de PCR de arranque en caliente pueden clasificarse en los grupos siguientes:

1. Barrera física para dividir todos los componentes esenciales en al menos dos compartimentos como se describe en las Pat. US Nos. 5.411.876, 5.565.339; 5.413.924 y 5.643.764. La barrera se elimina calentando a temperatura elevada.

40 2. Inhibidores reversibles de la enzima para suprimir la actividad de la enzima a temperatura baja como se describe en las Pat. US Nos. 5.338.671; 5.677.152; 5.773.258; 6.183.998; 5.693.502, 5.874.557, 5.763.173, 6.020.130 y 6.183.967. La unión del inhibidor es bien no covalente o covalente. El arranque en caliente por estos métodos es homogéneo y es el usado más ampliamente.

3. Separación de fase del cofactor como se describe en la Pat. US No. 6.403.341. El Mg^{2+} se precipita a temperatura baja y se vuelve soluble al aumentar la temperatura.

45 La RT PCR en una etapa es un proceso para amplificar ARN diana combinando la molécula de ARN que se transcribe de manera inversa y amplificando la molécula de ADN complementario en un vial. Las moléculas de ARN diana incluyen VIH, HCV, Virus del Nilo Oeste (WNV), virus de influenza humana, virus de la gripe aviar, virus del Dengue, Virus de Ébola etc. En los Estados Unidos, es obligatorio ensayar la presencia de VIH, HBV, HCV y WNV en la sangre de donantes. El rendimiento de la RT PCR en una etapa es crítico para estos ensayos clínicos y el cribado de sangre. Desafortunadamente ninguna de las tecnologías de arranque en caliente existentes puede aplicarse bien en este proceso porque:

50 1. La mayoría de las transcriptasas inversas, la enzima clave para la transcripción inversa, no pueden ser una diana para el proceso de arranque en caliente porque no son termoestables y perderían actividad después de la incubación a temperatura alta.

2. La molécula de ARN, la materia del ensayo, no es estable y experimenta una degradación significativa a temperatura alta. La presencia de iones metálicos divalentes, tales como Mg^{2+} , hace que la degradación sea más severa. Ninguna de las tecnologías existentes podría aplicarse sin dañar las moléculas de ARN diana.

- 5 3. La incubación durante mucho tiempo del proceso de transcripción inversa, habitualmente 30 minutos o más, incrementa tremendamente la posibilidad de tener reacciones laterales que podrían reducir dramáticamente la sensibilidad de la detección. Esto muestra que la tecnología de arranque en caliente basada en inhibidor de la enzima no mejoraría el rendimiento de la RT PCR en una etapa.

Debido a la importancia práctica de la amplificación de los ácidos nucleicos, existe una fuerte demanda de una nueva tecnología que pueda mejorar el rendimiento de la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos, especialmente la RT PCR en una etapa. En esta aplicación se describe un nuevo comienzo controlado de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

10 US 6.509.157 describe un método para amplificar una secuencia diana de ácido nucleico, en el que dicho método comprende realizar una reacción de amplificación usando un par de cebadores, en el que al menos un cebador de dicho par se bloquea reversiblemente por la unión covalente de un grupo triarilmetilo en el OH del 3' terminal. En este documento, el cebador bloqueado se revirtió con calor.

15 WO 02/100873 describe el uso de oligonucleótidos protegidos que se refiere a oligonucleótidos que están modificados por modificación química reversible. Los grupos protectores usados incluyen trimetoxitritilo, dimetoxitritilo, monometoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo y 9-(p-metoxifenil)xanten-9-ilo.

20 US 6.355.432 describe que uno de los grupos protectores 3'-O más comunes es el éster en particular el acetato. Describe además que estos grupos pueden eliminarse por tratamiento con base suave.

WO 94/04548 describe una modificación química reversible de oligonucleótidos aplicable al ciclo de aptámero. La modificación de enlaces específicos se define por el uso de uno o más análogos de nucleósido trifosfato apropiados como se ejemplifica por un tio-2'-dioxinucleósido trifosfato. Después del ciclo de amplificación, el oligonucleótido se modifica químicamente en el núcleo. Los oligonucleótidos modificados se someten a su ciclo de selección. Los oligonucleótidos modificados seleccionados se convierten de nuevo en oligonucleótidos no modificados seguido de amplificación por métodos estándar tal como PCR.

30 WO 96/07669 describe un método para sintetizar un polinucleótido de una secuencia predeterminada, método que comprende las etapas de: a) proporcionar un sustrato de inicio que comprende un nucleósido que tiene un grupo hidroxilo no protegido en 3'; y b) hacer reaccionar bajo condiciones enzimáticas en presencia de una cantidad catalítica de una enzima dicho grupo hidroxilo en 3' de dicho sustrato de inicio con un nucleósido 5'-trifosfato que tiene un resto bloqueante eliminable que protege la posición 3' de dicho nucleósido 5'-trifosfato y seleccionado según el orden de dicha secuencia predeterminada, mediante lo cual dicha enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster 5' a 3' entre dicho grupo hidroxilo en 3' no protegido de dicho sustrato de inicio y el 5'-fosfato de dicho nucleósido 5'-trifosfato para producir dicho polinucleótido.

35 WO 96/39414 describe procesos para sintetizar oligonucleótidos que permiten la desprotección del oligonucleótido bajo condiciones más suaves. La publicación proporciona además un grupo protector de base de nucleósido que es estable bajo las condiciones de la síntesis del oligonucleótido, pero que puede eliminarse bajo condiciones más suaves que los grupos protectores existentes, así como sintones de nucleósido que tienen dichos grupos protectores de base. La publicación también proporciona oligonucleótidos que contienen cualquiera de varias funcionalidades sensibles a base y métodos para usar dichos oligonucleótidos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que no ha existido una tecnología de arranque en caliente que implique oligonucleótidos, y que como un componente esencial para la amplificación de ácidos nucleicos, el oligonucleótido es una diana ideal para tecnologías de arranque en caliente o de arranque controlado.

45 La presente invención proporciona un método para la amplificación de una secuencia o señal de ácido nucleico diana, en el que se usa una mezcla de reacción de la amplificación que contiene al menos un oligonucleótido modificado reversiblemente que tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y un intervalo de temperatura.

La presente invención también proporciona un método para la amplificación de una secuencia o señal de ácido nucleico diana, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana con una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que dicho oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y un intervalo de temperatura;

(b) exponer la mezcla de la etapa (a) a dicho compuesto químico y dicho intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo; y

(c) llevar a cabo la reacción de amplificación.

5 La presente invención también proporciona un método para la amplificación de una secuencia de ácido ribonucleico diana, comprendiendo el método las etapas de:

10 (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el ácido ribonucleico diana con una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un primer oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que el primer oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un primer compuesto químico y un primer intervalo de temperatura;

(b) incubar la mezcla de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la transcripción inversa del ácido ribonucleico

(c) exponer la mezcla de la etapa (b) a dicho primer compuesto químico y dicho primer intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo del primer oligonucleótido modificado reversiblemente; y

15 (d) llevar a cabo la reacción de amplificación para formar productos de extensión del cebador.

20 En una realización del método para la amplificación de una secuencia de ácido ribonucleico diana, la mezcla de la reacción de amplificación comprende además al menos un segundo oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que el segundo oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un segundo compuesto químico y un segundo intervalo de temperatura; y en el que el método comprende además una etapa de exposición de la mezcla de la etapa (a) a dicho segundo compuesto químico y dicho segundo intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo del segundo oligonucleótido modificado reversiblemente antes de la etapa (b).

25 La presente invención también proporciona un oligonucleótido modificado reversiblemente que tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y/o irradiación y/o un intervalo de temperatura.

La presente invención también proporciona una mezcla de reacción o kit de amplificación de ácidos nucleicos que comprende el oligonucleótido modificado reversiblemente de la presente invención.

30 Los ejemplos del extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo del oligonucleótido modificado reversiblemente de la presente invención son, pero no están limitados a, un éster de ácido carboxílico, un grupo éter que incluye éter de sililo y un grupo fotolítico.

35 En una realización preferida, el método de la invención es útil en un proceso de RT-PCR en una etapa con un sistema de dos enzimas, en el que al menos se usa una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa termoestable, o con un sistema de una enzima, en el que sólo se usa una enzima que funciona tanto como una transcriptasa inversa como una ADN polimerasa.

En otra realización preferida, al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% y lo más preferiblemente al menos 90% del extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo del oligonucleótido modificado reversiblemente de la invención se convierte en un extremo 3' hidroxilo.

40 La amplificación de ácidos nucleicos de arranque controlado basada en oligonucleótido de la presente invención, además de ser una tecnología de arranque en caliente alternativa, puede mejorar el rendimiento de varias reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, especialmente las reacciones de RT-PCR.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1a Modificación del oligonucleótido con un anhídrido.

45 En presencia del catalizador DMAP en TEA, los grupos hidroxilo del oligonucleótido, incluyendo tanto el grupo hidroxilo en 5' como 3', forman un éster con el anhídrido maleico.

Figura 2. Hidrólisis del éster maleico del oligonucleótido.

La hidroxilamina es un compuesto químico nucleofílico fuerte y puede romper eficazmente el enlace éster carboxílico. Como resultado, los dos grupos hidroxilo en 5' y 3' se regeneran y se forma una hidroxiamida.

Figuras 3 Modificación del oligonucleótido con un cloruro de trialkylsililo.

Los grupos hidroxilo en 5' y 3' de un oligonucleótido reaccionan con cloruro de terc-butildimetilsililo en presencia de imidazol para formar éter de terc-butildimetilsililo.

Figura 4. Escisión de éter de sililo con fluoruro.

El éter de sililo se hidroliza con fluoruro. Tanto los grupos hidroxilo en 5' como 3' se regeneran como resultado de la hidrólisis.

Figuras 5 Reducción de la formación de dímeros de cebador con oligonucleótido modificado en PCR de ADN.

La Figura 5a es la curva de amplificación con oligonucleótidos no modificados normales (R) y oligonucleótido modificado (M) en presencia de molde (T⁺) o ausencia de molde, es decir, control sin molde (NTC). La PCR se hizo con polimerasa Taq de arranque en frío normal. La amplificación se monitorizó con tinción Sybr Green™, un fluoróforo de tinción de ácido nucleico específico de doble cadena. Sybr Green™ detecta ADN bicatenario de una manera no específica de la secuencia. Por lo tanto, se detecta tanto el dímero de cebador como la secuencia diana amplificados. El dímero de cebador y la secuencia diana se distinguen por las curvas de fusión de los productos amplificados (Figura 5b).

Figuras 6. Ausencia de eficacia de la ADN polimerasa Taq de arranque en caliente para evitar la formación de dímeros de cebador bajo la condición de reacción de RT PCR en una etapa con oligonucleótidos no modificados normales.

Bajo la condición de RT PCR en una etapa, tanto la ADN polimerasa Taq normal (regT) como la ADN polimerasa Taq de arranque en caliente (hsT) produjeron sólo dímeros de cebador independientemente de la presencia de molde (T⁺) o ausencia de molde (control sin molde, NTC). Las curvas de amplificación y de fusión se muestran en las Figuras 6a y 6b respectivamente.

Figura 7 Reducción de la formación de dímeros de cebador con los oligonucleótidos modificados.

Todas las reacciones de PCR se hicieron con ADN polimerasa Taq normal en ausencia de molde. Por lo tanto, todos los productos observados aquí son dímeros de cebador. Es una forma para medir cuánto dímero de cebador se forma bajo diferentes condiciones. Cuando más dímero de cebador se forma, antes surge la curva de amplificación.

Los oligonucleótidos no modificados normales (R) produjeron dímeros de cebador. La presencia de la transcriptasa inversa (RT⁺) dio lugar a más formación de dímeros de cebador que la ausencia de la transcriptasa inversa (RT⁻) como se refleja en una diferencia de ~4 ciclos en el valor Ct. Por el contrario, el dímero de cebador se reduce de manera importante con los oligonucleótidos modificados (M). La presencia de la transcriptasa inversa no dio lugar a más formación de dímeros de cebador.

Figura 8. Mejora del rendimiento de la RT PCR en una etapa con los oligonucleótidos modificados.

Con los oligonucleótidos modificados (M), la Ct del dímero de cebador se retrasa 11 ciclos en comparación con la de los oligonucleótidos normales (R). Con los oligonucleótidos normales, la formación severa de los dímeros de cebador causó una ausencia de amplificación de la secuencia diana incluso en presencia de 1.250 copias de secuencia diana (Figura 8b). Por el contrario, los oligonucleótidos modificados proporcionaron una clara amplificación de la secuencia diana sin dímeros de cebador como se revela por la curva de fusión de los productos amplificados.

Tabla 1. Número de especies posibles de dímeros de cebador frente al número de oligonucleótidos presente en un sistema de amplificación.

La tabla se genera tomando como base las suposiciones siguientes:

1. Cada diana se amplifica con dos oligonucleótidos diferentes;
2. Cada dímero de cebador (PD) se forma con dos oligonucleótidos diferentes.
3. Cualesquiera dos oligonucleótidos podrían formar sólo un dímero de cebador.

El número de especies de dímero de cebador posibles (#PD) se calcula con la ecuación siguiente:

$$\#PDs = N(2N-1)$$

N es el número de dianas que se va a amplificar.

Cuando N aumenta, el número de oligonucleótidos requerido aumenta linealmente. Mientras tanto, #PD sube geométricamente. Por ejemplo, hay dos oligonucleótidos en un sistema de amplificación uniplex. En dicho sistema uniplex, hay sólo una amplificación dirigida por diana y una especie de dímero de cebador. La relación de #PD/N es 1. En un sistema de amplificación de decaplex, hay veinte oligonucleótidos y 10 secuencias diana. Ahora, #PD aumenta hasta 190. La relación de especies #PD/N se vuelve 19.

El aumento geométrico del número de especies de dímero de cebador hace la PCR multiplex muy exigente especialmente en un sistema RT PCR en una etapa en el que la posibilidad de la formación de dímeros de cebador está muy aumentada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método para amplificar una secuencia o señal de ácido nucleico diana, en el que se usa una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un oligonucleótido modificado reversiblemente que tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y un intervalo de temperatura.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amplificación de ácido nucleico" se refiere a la amplificación de la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, RCR, RT-PCR) o a la amplificación de la señal de ácido nucleico (por ejemplo, ensayo invasor).

15 Normalmente, un oligonucleótido usado en la amplificación de ácidos nucleicos tiene un grupo hidroxilo en 3'. El grupo hidroxilo en 3' es esencial para que el oligonucleótido: i. sea extendido por una polimerasa de ácido nucleico; y ii. sea ligado por una ligasa de ácido nucleico. También influye en: i. la susceptibilidad a la actividad nucleasa 3'→5' que se denomina actividad para corregir fallos; y ii. la formación de una estructura escindible en un ensayo invasor. Así, la modificación del grupo hidroxilo en 3' del cebador de oligonucleótido inhibiría eficazmente su función en la reacción de amplificación.

Los criterios para elegir un grupo modificador apropiado son:

1. Un proceso produce el oligonucleótido con modificación completa o casi completa.
- 20 2. El oligonucleótido modificado es estable bajo la condición de almacenamiento. El oligonucleótido se almacena habitualmente en disolución acuosa a 4°C o -20°C. No se produce la reversión automática mensurable bajo la condición.
- 25 3. El compuesto químico usado para revertir la modificación y los productos que surgen de la escisión no interfieren con el proceso de amplificación del ácido nucleico. Como se prefiere hacer un arranque controlado en un sistema homogéneo sin una etapa adicional de manipulación, es importante que el compuesto químico y/o los productos escindidos no inhiban la actividad de la enzima (polimerasa, ligasa, nucleasa etc.) significativamente ni cambien la especificidad de la reacción.
- 30 4. La temperatura a la que se realiza eficazmente la reversión es compatible con la termoestabilidad de la enzima para el sistema de reacción. Por ejemplo, lo mejor sería que la reversión ocurriera a una temperatura mayor de 60°C en un sistema de PCR. Para la amplificación de ácidos nucleicos por TMA, la reversión debería hacerse por debajo de 45°C.

En una realización preferida, el oligonucleótido modificado reversiblemente de la invención tiene un éster de ácido carboxílico en 3'. Para regenerar el grupo hidroxilo en 3', se usa un compuesto químico seleccionado de pero no limitado a azida, imidazol, piridina, hidroxilamina, hidrazina, hidróxido de tetrabutylamonio.

35 En otra realización preferida, el oligonucleótido modificado reversiblemente de la invención tiene un éter de sililo en 3'. Para eliminar el grupo sililo en 3' y regenerar el grupo hidroxilo en 3', se incluye un compuesto químico que contiene fluoruro en el sistema de reacción.

En otra realización preferida, el oligonucleótido modificado reversiblemente de la invención tiene un grupo éter en 3'.

40 En otra realización preferida, el oligonucleótido modificado reversiblemente de la invención tiene un grupo modificado en 3' que puede experimentar escisión fotolítica para generar un grupo hidroxilo en 3'. El grupo fotolítico se elimina con luz o en combinación con un compuesto químico.

El modificador del oligonucleótido de la presente invención se une al oligonucleótido por:

1. Modificación posterior a la síntesis.
2. Sintetizador de oligonucleótido usando un soporte de síntesis que tiene un modificador.
- 45 3. Sintetizador de oligonucleótido usando un soporte de síntesis que tiene un nucleósido modificado.
4. Sintetizador de oligonucleótido usando un nucleósido modificado con fosoramidita. La dirección de la síntesis es bien 5' a 3' ó 3' a 5'.
5. Sintetizador de oligonucleótido usando un reactivo.

Además de la mejora de la amplificación cualitativa de los ácidos nucleicos por el arranque en caliente de la reacción de PCR, la invención descrita aquí es capaz de mejorar la amplificación de los ácidos nucleicos por amplificación isotérmica cualitativamente y cuantitativamente.

5 Hay publicaciones sobre la detección cuantitativa de los ácidos nucleicos por varias tecnologías de amplificación isotérmica incluyendo SDA, TMA, NASBA, RCA (Walker, 1996; Spears, 1997; Nadeau, 1999; Leone, 1998; Nilsson, 2002). Sin embargo, la exactitud y precisión de estos ensayos necesita mejorarse claramente. Una causa de la baja cuantificación es la ausencia de un arranque controlado de la reacción de amplificación.

10 Según la presente invención, un oligonucleótido usado en la amplificación de ácidos nucleicos tiene un resto en 3' distinto de un grupo hidroxilo. Sin embargo, el grupo hidroxilo en 3' puede generarse por exposición a un compuesto químico y/o irradiación y/o un intervalo de temperatura. La regeneración del grupo hidroxilo en 3' permite la amplificación de los ácidos nucleicos por:

i. La amplificación de la secuencia diana con polimerasa de ácido nucleico.

15 Los procesos de amplificación de la secuencia diana mediados por polimerasa incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación con círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica con un único cebador (SPIA™), amplificación isotérmica con un único cebador exponencial (X-SPIA™), amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y replicación de secuencia auto-sostenible (3SR).

El grupo hidroxilo en 3' se requiere para la reacción de polimerización de los ácidos nucleicos.

ii. Amplificación de la secuencia diana mediada por ligación.

20 En esta categoría, la ligación es una etapa clave para conseguir la amplificación de la secuencia diana. Las tecnologías incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), LCR activada como se describe en la Pat. US No. 6.511.810; LCR gap (Pat. US No. 5.427.930) y PCR mediada por ligación.

25 En la PCR mediada por ligación, la ligación ocurre antes del proceso de PCR. La ligación es para añadir una secuencia de cebador a la diana. Los oligonucleótidos tanto para la reacción de ligación como de PCR son materia de la presente invención.

iii. Ensayo invasor

30 El ensayo invasor (Pat. U.S. Nos. 6.348.314; 6.090.543; 6.001.567; 5.985.557; 5.846.717; y 5.837.450) es un ensayo de amplificación de la señal. El molde diana, un oligonucleótido invasor en 5' y un oligonucleótido en 3' que parcialmente se superpone con el oligonucleótido invasor forman una estructura invasora. La endonucleasa flap escinde el oligonucleótido en 3' para generar la señal de detección. Se encontró que el extremo 3' del oligonucleótido invasor influye en la escisión de manera importante. De hecho, la estructura de escisión formada con el oligonucleótido invasor que tiene un extremo 3' distinto de hidroxilo mostró una escisión reducida dramáticamente.

35 Mediante la supresión de la formación de dímeros de cebador/reacción no específica por debajo de la temperatura de reacción y controlando el inicio de la reacción, la presente invención mejorará la sensibilidad y la capacidad de cuantificación de los métodos anteriores de amplificación de ácidos nucleicos.

40 El oligonucleótido de la presente invención contiene una secuencia que es capaz de hibridación específica con una secuencia de ácido nucleico diana deseada. En una realización, el oligonucleótido contiene una secuencia complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana sólo. En otra realización, tiene una región no complementaria a la secuencia diana. La secuencia no complementaria está localizada en la región 5' del oligonucleótido.

En otra realización, el oligonucleótido de la presente invención tiene una estructura secundaria que cambia, por ejemplo, disminuye o desaparece, después de la formación del dúplex que resulta de la amplificación.

El oligonucleótido puede consistir en cinco partes:

i. Bases;

45 ii. Grupo azúcar

iii. Enlace entre nucleósido

iv. Un grupo de generación de señal para la detección

v. Otros grupos.

50 i. Las bases incluyen cualesquiera bases naturales, sin ninguna limitación, adenina, N⁶-metil adenina, N⁶-isopentenil adenina, guanina, 7-metil guanina, queuosina, wyosina, inosina, citosina, 3-metil citosina, 5-metil citosina, uracilo,

dihidrouracilo, pesudouracilo, 4-tiouracilo, y timina. Los análogos de bases, que también pueden usarse, incluyen, sin ninguna limitación, 7-deaza-adenina, 7-deaza-guanina, 2-amino purina, 2,6-diamino purina (adenina y guanina), 2- y/o 6-tio purina (adenina y guanina), 5-bromo uracilo, 5-nitro indol, 5-propinil uracilo, iso-citosina, iso-guanina, 5-fenil-uracilo, 2-N-metilguanina, 5-butilil-uracilo, dimetiltiliazol uracilo, 5-propinil citosina, 5-fenil-citosina, 5-butilil-citosina, dimetiltiliazol citosina, 9-(aminoetoxi) fenoxazina, 5-(N-aminohehil) carbamoil-uracilo, 6-azatimina, N²-imidazolilpropil-2-amino adenina, N²-imidazolilpropil-guanina, bases modificadas como se describe en la Pat. US No. 6.001.611. Las bases usadas más comúnmente son adenina, guanina, citosina y timina.

ii. El núcleo del oligonucleótido puede consistir en un enlace fosfodiéster normal 5' a 3' o varias modificaciones de éste. Los ejemplos de modificaciones incluyen enlace peptídico como se observa en ácidos nucleicos peptídicos (PNA), fósforotioato, fósforoditioato, N3'-->O5' fósforoamidato, O3'-N5' fósforamidato, 3' fósforotiolato, 5' fósforotiolato, enlace invertido, metilfosfonato, ácido morfolino nucleico, boranofosfonato, fósforo-N-butilamidatos y metilenmetiliminas, espaciador d y conectores de carbono.

iii. El grupo azúcar del oligonucleótido usado en la presente invención es habitualmente ribosa y/o 2-desoxiribosa. Puede contener uno o más tipos de restos azúcar diferentes, por ejemplo, 2-O-alkil ribosa, 2-amino ribosa, 2-fluoro ribosa, arabinosa, 2-desoxi arabinosa, 2-desoxi-2-fluoro arabinosa, 1,5-anhidro hexitol, 2-O,4-C-metilen ribosa como en ácido nucleico cerrado (LNA) y núcleo ciclohexeno.

iv. Según la presente invención, el oligonucleótido puede incluir un resto de señalización. El resto puede ser cualquiera que sea adecuado para la detección por métodos físicos, químicos fotoquímicos, inmunoquímicos y bioquímicos incluyendo, pero sin limitarse a fluorescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, fosforescencia, espectrometría en tiempo resuelto, polarización de fluorescencia, reacción enzimática, radiactividad, colorimetría, espectrometría de masas, magnetismo, movilidad electroforética y cromatografía.

En una realización, el resto de señalización incluye un resto indicador y un resto regulador separados por una secuencia que puede formar un sitio de escisión para una nucleasa o una ribozima. Un ejemplo es el ensayo Q-zyme Takara/Clontech.

En otra realización, el resto de señalización incluye un resto marcado y un resto apantallador que apantalla el resto marcado cuando el oligonucleótido está en estado monocatenario. Después de formar la estructura bicatenaria, se genera la señal. Amplifluor™ y Scorpion™ son dos tecnologías representativas de esta categoría. Dicha interacción entre el resto marcado y el resto apantallador puede ser entre cualesquiera entidades adecuadas incluyendo sin ninguna limitación moléculas pequeñas, por ejemplo, fluoróforos y sus apantalladores y moléculas grandes, por ejemplo, moléculas de proteína (Boute, 2002). La interacción también puede basarse en cualquier mecanismo adecuado. Por ejemplo, el resto marcado y el resto apantallador pueden interactuar entre sí en base a transferencia de energía resonante incluyen sin ninguna limitación transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), transferencia de energía resonante de luminiscencia (LRET), transferencia de energía resonante de fosforescencia (PRET) y transferencia de energía resonante de bioluminiscencia (BRET).

Entre los diferentes restos marcados y restos apantalladores, las sondas FRET se han usado ampliamente en la detección de moléculas diana amplificadas. La sonda FRET usada más comúnmente tiene dos restos interactivos. Uno es un grupo donante de fluorescencia y el otro es un grupo aceptor de fluorescencia. Aunque el grupo aceptor puede ser fluorescente, se prefiere que tenga un grupo no fluorescente como aceptor. El grupo donante puede ponerse en el extremo 5', en el medio o en el extremo 3'. Lo mismo que el grupo aceptor. Se prefiere poner el grupo donante en el extremo 5'. La escisión de la sonda con una nucleasa específica de estructura cuando la sonda hibrida con un ácido nucleico diana separará el grupo donante del grupo aceptor y liberará el apantallamiento de la fluorescencia del donante por el aceptor.

El resto de señalización de la sonda de la presente invención también puede tener más de dos restos interactivos. Por ejemplo, la Pat. U.S. No. 5.952.180 describe un método para preparar un oligonucleótido extensible con un espectro de emisión de fluorescencia distinguible. El espectro de emisión de fluorescencia único se genera por etiqueta de transferencia de energía de fluorescencia combinatoria. Otro ejemplo se refiere a una sonda de desplazamiento de longitud de onda con tres grupos interactivos como se describe en la Pat. U.S. No. 6.037.130.

En otra realización más, el oligonucleótido en sí mismo puede ser un resto regulador que interactúa con un resto indicador. Por ejemplo, Nurmi ha publicado la síntesis de una sonda quelato de terbio fluorescente marcada por separado y su uso en la detección de productos de PCR (Nurmi, 2000).

El oligonucleótido también puede ser parte de un generador de señal binario o trinario. Por ejemplo, la sonda de la presente invención puede ser un oligonucleótido binario preparado según los métodos descritos en la Pat. U.S. No. 6.432.642. Otra sonda binaria que contiene dos oligonucleótidos complementarios se describe en Li et al. (Li, 2002). La sonda de la presente invención también puede ser una molécula tripartita preparada por los métodos descritos para hacer una baliza molecular tripartita (Nutiu, 2002). Una diferencia sería que el oligonucleótido participa tanto en la reacción de amplificación como de detección.

v. El oligonucleótido de la presente invención también puede contener grupos en posiciones seleccionadas. Los grupos incluyen, pero no están limitados a, ligante de surco menor, pireno, colesterol, acridina, biotina, modificador de la movilidad de electroforesis capilar, amina, carboxilo, fosfato, tiol para facilitar la unión a la diana, conjugación a la superficie u otras moléculas o detección por electroforesis capilar.

- 5 La modificación de los grupos hidroxilo en un oligonucleótido es una práctica común para proteger el grupo hidroxilo, para marcar el oligonucleótido, para añadir un grupo funcional especial, para alterar varias propiedades tales como resistencia a nucleasa, afinidad de la unión, etc. Por ejemplo, se usa anhídrido acético en presencia de N-metilimidazol y tetrahidrofurano (THF) para terminar la cadena en la síntesis de oligonucleótido automatizada.

Para la presente invención, el grupo modificado adecuado tiene que cumplir los criterios siguientes:

- 10 1. Capacidad para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.

Se prefiere que 10% a 100% del oligonucleótido modificado regenere su grupo hidroxilo en 3'. Se prefiere más que al menos 50% del oligonucleótido modificado regenere su grupo hidroxilo en 3'. Se prefiere aún más que al menos 75% del oligonucleótido modificado regenere su grupo hidroxilo en 3'. Lo que más se prefiere es que al menos 90% del oligonucleótido modificado regenere su grupo hidroxilo en 3'. La regeneración puede ocurrir antes de que empiece la
15 amplificación del ácido nucleico o que suceda gradualmente al realizarse el proceso de amplificación.

2. Un proceso de modificación robusto produce un oligonucleótido con modificación completa o casi completa. La presencia de oligonucleótido no modificado en un sistema de amplificación de ácidos nucleicos podría socavar el beneficio de esta invención. El porcentaje del oligonucleótido no modificado que produce dicho impacto negativo depende de un sistema de amplificación particular.

- 20 3. El oligonucleótido modificado debe ser estable bajo la condición de almacenamiento sin reversión automática mensurable. La disolución de almacenamiento tiene que ser compatible con el sistema de reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

También debe tener una estabilidad adecuada en una mezcla de reacción en la que están presentes todos los componentes de la reacción. Esto es especialmente importante para la activación asistida por compuestos químicos.
25 Se prefiere que la temperatura elevada pueda acelerar en gran medida el proceso de activación.

4. La condición de la reacción inversa es compatible con el proceso de amplificación de ácidos nucleicos. La activación del oligonucleótido modificado en 3' se hace preferentemente en el mismo sistema de reacción que el sistema de amplificación de ácidos nucleicos. Por lo tanto, el compuesto químico usado para la activación, productos de activación, temperatura, pH, fuerza iónica, disolvente, longitud de onda e intensidad de luz en un proceso de foto-
30 activación, etc. deben ser todos compatibles con el proceso de amplificación de ácidos nucleicos.

Un oligonucleótido de la presente invención tiene un grupo en 3' que consiste en un grupo distinto de hidroxilo. Los grupos preferidos son:

1. Un grupo éster de ácido carboxílico
2. Un éter incluyendo un grupo éter de sililo

- 35 3. Un grupo fotolítico

El modificador del oligonucleótido de la presente invención se une al oligonucleótido por:

1. Modificación posterior a la síntesis.
2. Sintetizador de oligonucleótido usando un soporte de síntesis que tiene un modificador.
3. Sintetizador de oligonucleótido usando un soporte de síntesis que tiene un nucleósido modificado.

- 40 4. Sintetizador de oligonucleótido usando un nucleósido modificado con fosforamidita. La dirección de la síntesis es bien 5' a 3' ó 3' a 5'.

5. Sintetizador de oligonucleótido usando un reactivo.

La síntesis por un sintetizador de oligonucleótido es más preferida que la modificación posterior a la síntesis.

- 45 Cuando se usa la modificación posterior a la síntesis para unir un grupo modificador al extremo 3', es muy probable que también se modifique un grupo hidroxilo libre en 5'.

En una realización preferida, un oligonucleótido de la presente invención tiene un grupo en 3' que consiste en un grupo éster de ácido carboxílico. El éster se selecciona de, pero no está limitado a, éster de formato, éster de benzoilformato, éster de haloacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmetoxiacetato, éster de fenoxiacetato,

éster de maleato y sus derivados, éster de succinato y sus derivados, éster de 4-oxopentanoato y éster de pivaloato, éster de crotonato, éster de 4-metoxicrotonato y 3-fenilpropionato.

Para regenerar el grupo hidroxilo en 3', se usa un compuesto químico. El compuesto químico es de, pero no está limitado a, azida, imidazol, piridina, hidroxilamina, hidrazina, hidróxido de tetrabutilamonio.

- 5 Cuando la acilación del oligonucleótido se hace después de la síntesis, la acilación del grupo hidroxilo en 3' con anhídrido requiere un disolvente básico tal como trietilamina (TEA), otros disolventes básicos son piridina, anilina, dietilamina, trimetilamina y pirrolidona. Se prefiere que esté presente en la reacción un catalizador tal como dimetilaminopiridina (DMAP), fluoruro, 1-metilimidazol, 4-pirrolinopiridina, 2-hidroxipiridina.

- 10 En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención tiene un éster de ácido maleico en 3'. Se usa hidroxilamina para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.

En otra realización, el oligonucleótido de la invención tiene un grupo éter de sililo en 3'.

- 15 El éter de sililo es de un grupo que consiste en éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de triisopropilsililo, éter de dimetilisopropilsililo, éter de dietilisopropilsililo, éter de dimetil hexilsililo, éter de t-butildimetilsililo, éter de t-butildifenilsililo, éter de tribencilsililo, éter de tri-p-xilsililo, éter de trifenilsililo, éter de difenilmethylsililo y éter de t-butilmethoxyfenilsililo.

Un grupo -OH puede convertirse en éter de sililo tratándolo con un cloruro de trialquilsililo en presencia de una base amina terciaria tal como imidazol, piridina y trietilamina.

- 20 Los éteres de sililo no se ven influidos por la mayoría de los agentes oxidantes y reductores y son estables en la mayoría de los ácidos y bases no acuosas. El grupo t-butildimetilsililo es estable en disolución acuosa en un intervalo de pH de 2 a 12, lo que le hace uno de los grupos modificadores de hidroxilo usados más ampliamente.

La estabilidad del éter de sililo se ha estudiado bien. El trimetilsililo es el que se silila más fácilmente. Sin embargo, también es el más lábil a la hidrólisis. El reemplazo de uno de los grupos metilo del grupo trimetilsililo por t-butilo proporciona un grupo t-butildimetilsililo, que es aproximadamente 10^4 veces más estable que el grupo TMS.

- 25 Los grupos éter de sililo se eliminan lo más comúnmente por tratamiento con ión fluoruro. El fluoruro se selecciona del grupo químico que consiste en fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de litio, ácido fluorhídrico.

En otra realización preferida, el oligonucleótido de la invención tiene un grupo éter en 3'. Un grupo éter preferido es éter de tetrahidrofurano.

Un grupo éter es éter de alilo. El éter de alilo se hidroliza con un catalizador de paladio o rodio.

- 30 Otro grupo éter es éter de p-metoxifenilo o p-metoxibencilo ó 3,4-dimetoxibencilo o éter de (4-metoxifenoxi)metilo. El éter se escinde con nitrato cérico amónico.

También pueden usarse los éteres sensibles a una hidrólisis mediada por un catalizador ácido de Lewis. Los éteres incluyen éter de metoxietoximetilo (MEM), metoximetilo (MOM), éter de guayacolmetilo (GUM), éter de tetrahidropirano, éter de tetrahidrotiofurano.

- 35 Los catalizadores ácido de Lewis adecuados para el propósito se seleccionan de ZnX_2 , MgX_2 , AgX , CuX_2 , MnX_2 , SnX_2 , FeX , CoX , PdX_2 , HgX_2 , FeX_3 , AlX_3 , $LiBF_4$, $TiCl_4$, etc. X es un átomo de halógeno.

El éter de siloximetilo o éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo en 3' puede eliminarse con fluoruro seleccionado del grupo químico que consiste en fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de litio, ácido fluorhídrico.

- 40 El éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo en 3' se hidroliza con $LiBF_4$ y/o fluoruro para regenerar el grupo hidroxilo.

El éter de metilo en 3' se hidroliza con uno o más compuestos químicos de un grupo que consiste en BBr_3 , $SiCl_4$, NaI y AlX_3 .

- 45 En otra realización preferida, el oligonucleótido de la invención tiene un grupo modificado en 3' que puede experimentar escisión fotolítica para regenerar el grupo hidroxilo en 3'. El grupo modificado en 3' se selecciona del grupo químico que contiene éter de p-metoxibencilo, ésteres de nitrato y carbonato de o-nitrobencilo.

Además de la escisión fotolítica, también puede añadirse un compuesto químico al sistema de reacción para reducir el requerimiento para intensidad y/o tiempo de la irradiación. Por ejemplo, aunque el éster de p-metoxibencilo se escinde con luz UV (>280 nm), puede añadirse nitrato cérico amónico al sistema de reacción para acelerar la reacción de hidrólisis.

La cinética y termodinámica del proceso de eliminación del modificador pueden verse influidas por el grupo modificador, propiedad del compuesto químico para la activación, concentración del compuesto químico, temperatura, otros componentes de un sistema de reacción tal como pH, fuerza iónica, etc. Si se usa irradiación para regenerar el grupo hidroxilo en 3', su intensidad y longitud de onda también pueden influir en la velocidad e integridad del proceso de activación.

Aplicación de la presente invención en varios procesos de amplificación de ácidos nucleicos

Para entender mejor cómo podría usarse la presente invención en varios procesos de amplificación de ácidos nucleicos, la presente invención se ilustra respecto a algunos de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos y enzimas implicadas disponibles actualmente.

Aplicación de la presente invención en el ensayo invasor

El ensayo invasor es un método de amplificación de la señal y se describe en las Pat. U.S. Nos. 6.348.314; 6.090.543; 6.001.567; 5.985.557; 5.846.717; y 5.837.450.

En el ensayo invasor, el oligonucleótido invasor en 5' y el oligonucleótido sonda que genera la señal en 3' hibridan con la molécula diana y forman una estructura de escisión. La escisión de la sonda hibridada por endonucleasa flap genera una señal detectable. Como otras enzimas termoestables, la endonucleasa flap es activa en un amplio rango de temperatura. Es capaz de escindir muchas estructuras además de las estructuras de escisión deseadas. Los oligonucleótidos presentes en un sistema de reacción podrían formar una variedad de estructuras intramoleculares e intermoleculares. La mayor parte de ellas sólo son estables a temperatura baja. La escisión de estas estructuras resulta en un fondo alto o en una señal detectable baja. La reducción o incluso la eliminación de estas escisión no deseadas puede mejorar la calidad del ensayo de detección.

El uso del oligonucleótido con extremo 3' modificado, como se describe en la presente memoria, es una buena forma de reducir la escisión no dependiente del molde. Se ha publicado que el grupo en 3' del oligonucleótido invasor en 5' afecta en gran medida a la escisión (Kaiser, 1999). Todas las sustituciones del grupo hidroxilo en 3' incluyendo 3' desoxi, 3' fosfato, y 3' espaciador d resultaron en una inhibición dramática. En algunos casos, las sustituciones rindieron una inhibición casi completa. Esto demuestra claramente la importancia del grupo hidroxilo en 3' en el evento de la escisión. La presente invención proporciona un método para usar un oligonucleótido con un extremo 3' modificado reversiblemente para controlar el inicio del ensayo invasor con el fin de mejorar su capacidad de cuantificación.

El ensayo invasor también es capaz de detectar moléculas de ARN sin transcripción inversa. La molécula de ARN es sensible al calor, particularmente en presencia de iones metálicos divalentes tal como Mg^{2+} , lo que es esencial para la acción de la nucleasa. Cuando se detecta el ARN diana, se prefiere que la condición del arranque en caliente sea suave. La presente invención ofrece numerosos modificadores con condiciones de activación diversas. Una condición suave de activación puede identificarse fácilmente. Un ejemplo de activación suave es irradiación que es lo suficientemente suave como para no dañar las moléculas de ARN diana. En este aspecto, la presente invención tiene una ventaja clara sobre las tecnologías de arranque en caliente con enzima basadas en modificación química.

Aplicación de la presente invención en la reacción en cadena de la polimerasa

Se ha documentado bien que el arranque en caliente puede mejorar la amplificación por PCR dramáticamente. Se han desarrollado muchos métodos de arranque en caliente para mejorar la amplificación por PCR. Pueden clasificarse en los grupos siguientes:

i. Creación de una barrera física que separa los componentes requeridos para la reacción lateral a baja temperatura.

Las Pat. US Nos. 5.411.876, 5.565.339, 5.413.924 y 5.643.764 describen técnicas para crear dicha barrera que desaparece al elevarse la temperatura. Sin embargo, es inconveniente. El mezclado de todos los componentes en dicho sistema heterogéneo es también muy exigente.

ii. Precipitación de magnesio (Pat. US No. 6.403.341)

El magnesio es un elemento clave para la actividad de la ADN polimerasa. Según la invención, el magnesio se precipita a temperatura baja y no puede participar en la reacción de polimerización del ADN. A una temperatura apropiada, la solubilidad del magnesio se incrementa. Consecuentemente, el magnesio se libera del precipitado y activa la ADN polimerasa. Éste es un sistema de arranque en caliente heterogéneo y se enfrenta a un problema similar al discutido en "i". La dispensación de magnesio precipitado es difícil de hacer.

iii. Unión no covalente reversible de una molécula inhibidora a la ADN polimerasa.

Dicha molécula inhibidora puede ser un anticuerpo (Pat. US No. 5.338.671) o un oligonucleótido (Pat. US Nos. 5.693.502, 5.874.557, 5.763.173, 6.020.130 y 6.183.967). La estabilidad del complejo inhibidor/ADN polimerasa es dependiente de la temperatura. Cuando la temperatura alcanza un punto determinado, el inhibidor se separa de la ADN polimerasa, que entonces se vuelve activa. Como inhibidor no covalente, es difícil obtener una inhibición

completa. También interfieren con la amplificación en un determinado grado, especialmente con inhibidor oligonucleotídico.

iv. Modificación química de la ADN polimerasa (Pat. US Nos. 5.677.152, 5.773.258 y 6.183.998)

Como los inhibidores no covalentes, éstos son sistemas de arranque en caliente homogéneos. Se usan anhídrido y aldehído de ácido dicarboxílico en estas modificaciones respectivamente. Los modificadores se eliminan de la ADN polimerasa con incubación prolongada a temperatura alta. La actividad de la ADN polimerasa se restaura con la eliminación de los modificadores. Son muy estrictos en términos de terminación de la supresión de la actividad de la enzima. Sin embargo, el proceso de activación es muy duro para la enzima. De hecho, el proceso de activación en sí mismo también desnaturaliza una parte significativa de las moléculas de enzima.

La presente invención también es un sistema de modificación química. En lugar de usar enzima modificada químicamente en PCR, se usa un oligonucleótido modificado en 3'.

Cuando el ADN diana quiere amplificarse por PCR, los oligonucleótidos modificados químicamente reversiblemente proporcionan arranque en caliente con alta astringencia de la misma manera que la enzima modificada químicamente. Sin ser activados, los oligonucleótidos modificados en 3' no pueden extenderse por la ADN polimerasa a temperatura baja. Por lo tanto, no podrían producirse los dímeros de cebador ni las reacciones laterales a temperatura baja. Diversas formas de activación, desde activación asistida químicamente a activación mediada por irradiación, hacen posible tener una condición de activación suave.

Cuando el ARN diana quiere amplificarse, el molde de ARN tiene que convertirse en ADN primero mediante un proceso de transcripción inversa. Si la transcripción inversa se hace en un tubo separado y una alícuota del producto de la transcripción inversa se usa para la amplificación por PCR, el proceso de PCR es esencialmente el mismo que el de con molde de ADN como se ha indicado anteriormente.

La RT PCR en una etapa es un proceso en el que tanto la transcripción inversa como la PCR se llevan a cabo en el mismo tubo secuencialmente. Como se ha discutido en la parte de "ANTECEDENTES", ninguna de las PCR de arranque en caliente existentes es eficaz para RT PCR en una etapa. Con la presente invención, la RT PCR en una etapa puede mejorarse significativamente.

Para RT PCR en una etapa uniplex, sólo habrá un oligonucleótido que tenga un grupo hidroxilo en 3' normal si se aplica la presente invención. Éste es para transcripción inversa. Se sabe que el dímero de cebador no puede surgir a partir de un único cebador.

Para un proceso de RT PCR en una etapa triplex, tal como el producto de Roche para el ensayo de sangre de donantes en el que se monitoriza la presencia de VIH, HBV y HCV, hay seis cebadores. HIV y HCV son ARN dianas y HBV es ADN diana. Hay 15 clases de dímeros de cebador que podrían formarse con las tecnologías convencionales (Tabla 1). Según la presente invención, 4 de los oligonucleótidos tienen un grupo modificado en 3'. Por lo tanto, sólo podría generarse una clase de dímero de cebador. La ventaja de la tecnología presente es obvia y significativa.

Empleando la presente invención, la RT PCR en una etapa puede mejorarse más usando modificaciones duales. Una modificación es para los oligonucleótidos requeridos para la transcripción inversa y la otra es para los oligonucleótidos que participan en la amplificación por PCR. Las dos modificaciones tienen dos condiciones de activación diferentes de manera que el comienzo de los procesos de transcripción inversa y de PCR puede controlarse de manera independiente. Esta estrategia será especialmente útil para RT PCR en una etapa multiplex. El o los cebadores de RT se activarán y estarán disponibles para la reacción de RT cuando la transcripción inversa esté a punto de empezar. Mientras tanto, el resto de los cebadores permanecerá inactivado hasta que empiece la PCR. Esto evitará que ocurra la formación de dímeros de cebador/reacción no específica antes del inicio de la RT. La etapa de activación puede hacerse de varias maneras. Por ejemplo, una modificación se elimina por irradiación y la otra por activación asistida químicamente. Otro ejemplo es que ambas modificaciones tengan una susceptibilidad diferente para el mismo compuesto químico/irradiación. La temperatura es otro factor clave que afecta la generación del grupo hidroxilo en 3'.

Aplicación de la presente invención a la reacción en cadena de la ligasa (LCR)

Como la PCR, la LCR es un método de amplificación de diana exponencial que implica termociclado. La detección de sensibilidad baja asociada con la LCR se atribuye en gran medida a la actividad residual de una ligasa termoestable a una temperatura inferior a su temperatura de reacción. En la LCR, la amplificación no dirigida por molde no se puede distinguir de la amplificación dirigida por molde.

Como el grupo hidroxilo en 3' es esencial para la reacción de ligación, la LCR con arranque en caliente con oligonucleótidos modificados en 3' usando la invención descrita en la presente memoria puede reducir o incluso eliminar la ligación no dirigida por molde a temperatura baja.

La Pat. US No. 6.511.810 describe un método para usar una endonucleasa flap termoestable para permitir la reacción de ligación. Cuando se incluye una sonda FRET en el sistema, puede usarse para hacer la cuantificación

en tiempo real de las moléculas diana. Aunque la invención mejora significativamente la detección por LCR, no se elimina la amplificación no dirigida por molde. El método descrito en la presente memoria puede reducir más el fondo. La presente invención es muy adecuada para realizar el arranque en caliente en este proceso.

5 Aplicación de la presente invención en amplificación en círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica con un único cebador (SPIA⁺), amplificación isotérmica con un único cebador exponencial (X-SPIA⁺), amplificación mediada por bucle (LAMP)

Estas técnicas se describen en las Pat. US Nos. 5.854.033; 6.183.960; 6.210.884; 6.344.329; 5.270.184; 5.916.779; 6.251.639 y 6.410.278 respectivamente. Un componente común para todos los procesos de amplificación isotérmica anteriores es el uso de una ADN polimerasa con una fuerte actividad de desplazamiento de cadena. La ADN polimerasa usada más ampliamente en estas tecnologías es el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst.

Aunque el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst es activo a una temperatura de hasta 65°C, no es termoestable. Por lo tanto, la modificación química de la enzima no es una forma viable de hacer el arranque en caliente. De hecho, todavía debe desarrollarse un sistema de arranque en caliente para estas tecnologías. Las condiciones de activación diversas asociadas con la presente invención hacen posible encontrar una condición compatible con cada tecnología de amplificación particular.

La aplicación de la presente invención a estos ensayos puede eliminar todas las reacciones laterales que ocurren antes del inicio de la amplificación. Los oligonucleótidos convencionales se reemplazan por oligonucleótidos de la presente invención. Idealmente, el grupo hidroxilo en 3' se regenera cuando la reacción de amplificación va a empezar.

La aplicación de la presente invención a estos procesos no sólo puede mejorar la sensibilidad de la amplificación sino también la cuantificación de la diana. La cuantificación mejorada de la diana se consigue mediante el inicio controlado de la amplificación.

Uso de la presente invención en asociación con NASBA, TMA y 3SR

Se usan principalmente para amplificar ARN diana a una temperatura constante. La amplificación comprende las etapas siguientes:

i. Transcripción inversa para preparar ADN complementario (ADNc).

Como resultado de la transcripción inversa se forma un heterodúplex ARN/ADN. El oligonucleótido usado en la transcripción inversa tiene una secuencia de unión a la diana en la región 3' y una región promotora de la ARN polimerasa en la región 5'. La secuencia promotora monocatenaria no es transcripcionalmente funcional hasta que se vuelve bicatenaria.

ii. Degradación con ARNasa H de la cadena de ARN en el heterodúplex ARN/ADN.

La actividad ARNasa H se proporciona por la transcriptasa inversa o por una ARNasa H independiente.

iii. Síntesis de ADN bicatenario.

Un segundo oligonucleótido hibrida con el ADNc monocatenario y se extiende por la transcriptasa inversa para generar un dúplex ADN/ADN. Ahora la región promotora para la ARN polimerasa correspondiente es bicatenaria y funcional.

iv. Síntesis de ARN monocatenario por transcripción in vitro.

Con un promotor funcional y una ARN polimerasa, cada dúplex ADN/ADN genera cientos de moléculas de ARN. Completa un ciclo de amplificación. Como resultado, cada molécula molde de ARN se amplifica cientos de veces.

v. Repeticiones de las etapas i a iv.

Esto amplificará el ácido nucleico diana exponencialmente.

La sensibilidad de estos ensayos no es en general tan buena como la de la PCR. Su capacidad de cuantificación tampoco es tan buena como la de la PCR. La aplicación de un inicio controlado en estos ensayos puede mejorar estos dos aspectos importantes. El inicio controlado reducirá eficazmente o incluso eliminará la reacción lateral. Esto mejorará la sensibilidad del ensayo.

El uso de la presente invención en estos procesos también mejorará su capacidad de cuantificación de la diana. Sin un sistema con inicio controlado, la reacción de amplificación empieza rápidamente justo después de que todos los componentes se han mezclado. El diferente tiempo de inicio de la amplificación entre las muestras y los estándares, en combinación con cinéticas de amplificación rápidas, hace que la cuantificación exacta y precisa sea

extremadamente difícil. El inicio controlado hará que toda la amplificación empiece al mismo tiempo. La cuantificación puede mejorarse significativamente.

El oligonucleótido de la presente invención se usa en la amplificación de ácidos nucleicos para reemplazar a su oligonucleótido equivalente convencional que tiene un grupo hidroxilo en 3'. La secuencia del oligonucleótido permanece igual.

Los expertos en la técnica entenderán que la magnitud del beneficio de la presente invención depende de la tecnología de amplificación del ácido nucleico, secuencia del oligonucleótido, sistema de reacción, condición de incubación, etc.

Los expertos en la técnica son capaces de hacer ajustes cuando el oligonucleótido de la presente invención reemplaza a un oligonucleótido convencional. Dependiendo del grupo modificador específico y del compuesto químico usado para regenerar el grupo hidroxilo en 3', puede ser necesario ajustar la concentración del oligonucleótido, sistema de tampón y condición de incubación para conseguir una condición de reacción óptima.

La presente invención puede usarse en combinación con otras tecnologías que pueden reducir la formación de dímeros de cebador/reacción no específica. Las tecnologías de arranque en caliente, como se ha discutido anteriormente, son ejemplos de dichas tecnologías. En el sistema de reacción también puede incluirse una proteína de unión a ADN monocatenario para reducir más la formación de dímeros de cebador e incrementar la especificidad de la detección.

El oligonucleótido de la presente invención es compatible con el uso de bases especiales y grupos azúcar en los tres primeros nucleótidos para reducir más la formación de dímeros de cebador y la reacción no específica. Estas dos técnicas se describen en las Pat. US Nos. 6.001.611 y 6.794.142 respectivamente.

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se muestran para proporcionar a los expertos en la técnica una revelación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos siguientes son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones.

Ejemplo 1. Modificación del oligonucleótido con anhídrido maleico

El mecanismo de reacción se ilustra en la Figura 1. Las secuencias de tres oligonucleótidos usados para detectar el virus de la Hepatitis B se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia del oligonucleótido

Oligonucleótido	Secuencia
Cebador directo:	CCG TCT GTG CCT TCT CAT CTG
Cebador inverso1	GGT TTC CAT GTA ACG TGC AG
Cebador inverso2	GGT CTC CAT GCG ACG TGC AG

Los oligonucleótidos liofilizados se disuelven en 1xTE (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA) a 100 μ M. Se prepara una disolución de 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (Aldrich) en trietilamina (TEA) (Aldrich) a 3 mg/ml. Se prepara anhídrido maleico (Aldrich) en N,N'-dimetil formamida (DMF) (Sigma).

Etapas 1. mezclar 16 μ l del oligonucleótido con 320 μ l de disolución de DMAP en un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml

Etapas 2. añadir 6 μ l de anhídrido maleico 4M a la mezcla de oligonucleótido/DMAP

Etapas 3. agitar con vórtex a alta velocidad durante 2 minutos a temperatura ambiente

Etapas 4. añadir 1.026 μ l de isopropanol y mezclar bien

Etapas 5. incubar a -20°C durante 2 horas

Etapas 6. centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C

Etapa 7. quitar el sobrenadante → añadir 800 µl de isopropanol → centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C

Etapa 8. repetir la etapa 7 una vez

Etapa 9. quitar el sobrenadante → secar el tubo a temperatura ambiente → disolver el oligonucleótido en agua.

5 Ejemplo 2. Preparación de ADN Polimerasa Taq

El gen de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) se clonó por PCR con secuencia de GeneBank (No. de Registro J04639). La purificación de la ADN polimerasa Taq se realizó con un procedimiento descrito por Lawyer et al. (Lawyer et al., 1989, JBC 264(11): 6427-37; Lawyer et al. 1989, PCR Meth. Appl. 2(4): 275-87).

Ejemplo 3. Modificación de la ADN Polimerasa Taq con Ácido Citracónico

- 10 El ácido citracónico (Aldrich) y N,N'-diciclohexil carbodiimida (DCC) (Aldrich) y NHS (Aldrich) se disolvieron en DMF a 1M. Se mezclaron 200 µl de DCC, 200 µl de NHS y 100 µl de ácido citracónico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se desechó y el sobrenadante se guardó para modificar la ADN polimerasa Taq.
- 15 La ADN polimerasa Taq purificada se ajusta a 1 mg/ml en 20 mM MOPS, pH 8,0, y 100 mM KCl. Se mezcló un volumen de ácido citracónico activado con 99 volúmenes de ADN polimerasa Taq. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con el fin de resultar en la inactivación de la ADN polimerasa Taq.

Ejemplo 4. Amplificación por PCR con oligonucleótidos modificados

- 20 Sybr Green se une preferentemente a ADN bicatenario con una afinidad más de 1.000 veces superior que al ADN monocatenario. Se ha usado ampliamente para monitorizar la amplificación por PCR en tiempo real. Aunque dicha unión no es específica de secuencia, es posible detectar diferentes productos amplificados haciendo análisis de curvas de fusión porque cada producto amplificado tiene una determinada temperatura de fusión. El ensayo con Sybr Green se usó en la invención para monitorizar la formación de dímeros de cebador así como la amplificación de la diana.
- 25

El sistema de PCR contiene 50 mM TrisHCl, pH 8,4, 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,005% gelatina, 1xSybr Green, 500 nM 5-ROX, 7,5 mM cloruro de hidroxilamina (Aldrich), 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y TTP, 1U de ADN polimerasa Taq, 200 nM de cada uno de los cebadores HBV no modificados o modificados con anhídrido maleico. El volumen de la reacción es 25 µl. Se añadieron al sistema 0 copias de molde HBV (control sin molde o NTC) ó 500 copias de HBV.

- 30 Las reacciones se realizaron en ABI Prizm 7000. La condición de termociclado es como sigue: 95°C, 10 min → (95°C, 5 seg → 60°C, 30 seg) X 40 ciclos.

Para revertir la modificación, son importantes tanto la pre-incubación a temperatura alta, es decir 95°C, 10 min, como la presencia de cloruro de hidroxilamina.

- 35 Los resultados se muestran en la Figura 5a. Comparado con los cebadores no modificados normales (NTC/R), la reacción NTC con cebadores modificados con anhídrido maleico (NTC/M) mostró una amplificación retrasada más de 7 ciclos. En otras palabras, la amplificación NTC o formación de dímeros de cebador se retrasó más de 7 ciclos. Esto demuestra claramente que los cebadores modificados son eficaces en la reducción de la formación de dímeros de cebador.

40 Ejemplo 5. Análisis de las curvas de fusión de los productos de PCR

En la Figura 5a, el molde HBV más la reacción con cebador normal (T⁺/R) mostró una amplificación casi 5 ciclos más temprana que el molde HBV más reacción con cebador modificado (T⁺/M). Sin reacción lateral tal como formación de dímeros de cebador, se espera que ambas tengan unas cinéticas de amplificación similares porque ambas contenían el mismo número de molde HBV. Requiere análisis adicional de los productos amplificados.

- 45 Se realizó análisis de las curvas de fusión. Los resultados se muestran en la Figura 5b. El molde HBV más la reacción con cebador normal (T⁺/R) tuvo dos productos, un producto principal que es el dímero del cebador con una temperatura de fusión de aproximadamente 77°C y un producto menor que es el producto amplificado dirigido por molde con una temperatura de fusión de aproximadamente 83°C. Por el contrario, el molde HBV más la reacción con el cebador modificado (T⁺/M) mostró una amplificación limpia. Sólo está presente un producto amplificado dirigido por molde.
- 50

Ejemplo 6. PCR con polimerasa Taq normal y polimerasa Taq modificada químicamente en presencia de transcriptasa inversa

Entre las diferentes tecnologías de PCR de arranque en caliente basadas en enzima, la modificación química reversible de la ADN polimerasa de PCR es la más estricta y eficaz. Se ha mostrado que mejora eficazmente la amplificación del molde de ADN y permite la amplificación por PCR multiplex.

Sin embargo, en un sistema de RT PCR en una etapa presenta dificultades que se indican en "ANTECEDENTES". Una enzima modificada químicamente se ensayó para su capacidad para reducir la formación de dímeros de cebador en presencia de transcriptasa inversa.

El sistema de PCR contiene 50 mM TrisHCl, pH 8,4, 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 7,5 mM cloruro de hidroxilamina (Aldrich), 0,01% Tween-20, 0,005% gelatina, 500 nM 5-ROX, 1xSybr Green, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y TTP, 4U de SuperScript III (Invitrogen), 200 nM de cada uno de los cebadores HBV no modificados, 1U de ADN polimerasa Taq normal sin arranque en caliente o de arranque en caliente modificada químicamente. El volumen de la reacción es 25 µl. Se añadieron al sistema 0 copias de molde HBV (control sin molde o NTC) ó 500 copias de HBV.

Las reacciones se realizaron en ABI Prizm 7000. La condición de termociclado es como sigue: 55°C, 15 min → 95°C, 10 min → (95°C, 5 seg → 60°C, 30 seg) X 40 ciclos.

La amplificación se muestra en la Figura 6a. Aunque la amplificación NTC con Taq modificada químicamente (NTC/hsT) se retrasó aproximadamente 2 ciclos en comparación con la Taq normal (NTC/regT), la amplificación NTC con Taq modificada químicamente es muy severa. En molde HBV más reacciones, la amplificación tanto con Taq normal como con Taq modificada químicamente alcanzó el umbral antes de lo habitual (véase la Figura 5a para referencia). El análisis de las curvas de fusión reveló que había sólo un dímero de cebador en las cuatro clases de amplificación en el experimento (Figura 6b). Esto demuestra que: i. la transcriptasa inversa puede mediar la formación de dímeros de cebador; ii. la enzima de PCR modificada químicamente no es eficaz para reducir la formación de dímeros de cebador cuando la transcriptasa inversa está presente en el sistema de reacción.

Ejemplo 7. PCR con oligonucleótido modificado

Con el fin de demostrar adicionalmente tanto el papel de la transcriptasa inversa para estimular de la formación de dímeros de cebador como la eficacia de los cebadores modificados reversiblemente para evitar la formación de dímeros de cebador, se realizó el experimento siguiente:

El sistema de PCR contiene 50 mM TrisHCl, pH 8,4, 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 7,5 mM cloruro de hidroxilamina (Aldrich), 0,01% Tween-20, 0,005% gelatina, 500 nM 5-ROX, 1xSybr Green, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y TTP, 1U de ADN polimerasa Taq sin modificar normal, 0U ó 4U de SuperScript III (Invitrogen), 200 nM de cada uno de los cebadores HBV no modificados. El volumen de la reacción es 25 µl. No se añadió molde HBV al sistema.

Las reacciones se realizaron en ABI Prizm 7000. La condición de termociclado es como sigue: 55°C, 15 min → 95°C, 10 min → (95°C, 5 seg → 60°C, 30 seg) X 40 ciclos.

Con los cebadores no modificados normales, la presencia de transcriptasa inversa en una reacción NTC (RT⁺/R) resultó en más dímero de cebador significativamente (Figura 7) que la ausencia de transcriptasa inversa (RT⁻/R), casi 4 ciclos antes.

Los cebadores modificados redujeron dramáticamente la formación de dímeros de cebador. En ausencia o presencia de 4U de transcriptasa inversa, la formación de dímeros de cebador se retrasó 7 (RT⁺/R frente a RT⁻/M) y 11 ciclos (RT⁺/R frente a RT⁺/M) respectivamente cuando se comparan con los cebadores normales. De forma más importante, mostró que la presencia de transcriptasa inversa no influye significativamente en la formación de dímeros de cebador cuando se usaron los cebadores modificados (RT⁻/M frente a RT⁺/M).

Ejemplo 8. Amplificación de diana con cebadores modificados

Para mostrar adicionalmente la eficacia de los cebadores modificados reversiblemente en la mejora de la amplificación por PCR en el entorno de la RT PCR en una etapa, se realizó el experimento siguiente:

El sistema de PCR contiene 50 mM TrisHCl, pH 8,4, 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 7,5 mM cloruro de hidroxilamina (Aldrich), 0,01% Tween-20, 0,005% gelatina, 500 nM 5-ROX, 1xSybr Green, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y TTP, 1U de ADN polimerasa Taq sin modificar normal, 4U de SuperScript III (Invitrogen), 200 nM de cada uno de los cebadores HBV no modificados o modificados. El volumen de la reacción es 25 µl. Se añadieron al sistema 0 copias de molde HBV (control sin molde o NTC) ó 500 copias de HBV.

Las reacciones se realizaron en ABI Prizm 7000. La condición de termociclado es como sigue: 55°C, 15 min → 95°C, 10 min → (95°C, 5 seg → 60°C, 30 seg) X 40 ciclos.

5 Como se muestra en la Figura 8a, los cebadores modificados redujeron eficazmente la formación de dímeros de cebador en 11 ciclos (NTC/M frente a NTC/R). La amplificación dirigida por molde con cebadores modificados (T^+/M) no contenía dímeros de cebador como se demuestra en la Figura 8b mientras que la amplificación con cebadores normales sólo rindió dímeros de cebador incluso en presencia de 500 copias de molde HBV (T^+/R en las Figuras 8a y 8b).

REFERENCIAS

DOCUMENTOS DE PATENTE US

5.338.671	8/1994	Scalice et al.	435/91.2
5.411.876	5/1995	Bloch et al.	435/6
5.413.924	5/1995	Kosak et al.	435/91.1
5.427.930	6/1995	Birkenmeyer et al.	435/91.52
5.565.339	10/1996	Bloch et al.	435/6
5.643.764	7/1997	Kosak et al.	435/91.1
5.677.152	10/1997	Birch et al.	435/91.2
5.773.258	6/1998	Birch et al.	435/91.2
5.693.502	12/1997	Gold et al.	435/91.2
5.763.173	6/1998	Gold et al.	435/6
5.773.258	6/1998	Birch et al.	435/91.2
5.874.557	2/1999	Gold et al.	536/22.1
6.001.611	12/1999	Will	435/91.2
6.020.130	2/2000	Gold et al.	435/6
6.183.967	2/2001	Jayasena et al.	435/6
6.183.998	2/2001	Ivanov et al.	435/91.2
6.403.341	6/2002	Barnes et al.	435/91.2
6.511.810	1/2003	Bi et al.	435/6
6.794.142	9/2004	Laird et al.	435/6

5 OTRAS PUBLICACIONES

- Kaiser et al., 1999, "A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases"
J. Biol. Chem. 274(30): 21387-21394.
- Leone et al., 1998, "Molecular beacon probes combined with amplification by NABSA enable
homogeneous, real-time detection of RNA" Nucleic Acids Res. 26(9): 2150-2155.
- Nadeau et al., 1999, "Real-time, sequence-specific detection of nucleic acids during strand
displacement amplification" Anal. Biochem. 276: 177-187.
- Nilsson et al., 2002, "Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified
molecular beacon design" Nucleic Acids Res. 30(14): e66.
- Spears et al., 1997, "Simultaneous strand displacement amplification and fluorescence
polarization detection of Chlamydia trachomatis DNA" Anal. Biochem. 247: 130-137.
- Walker et al., 1996, "DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence
polarization with signal enhancement using a DNA binding protein" Nucleic Acids Res.
24(2): 348-353.

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una secuencia o señal de ácido nucleico diana, en el que se usa una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un oligonucleótido modificado reversiblemente que tienen un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y un intervalo de temperatura.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana con una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que dicho oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un compuesto químico y un intervalo de temperatura;
 - (b) exponer la mezcla de la etapa (a) a dicho compuesto químico y dicho intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo; y
 - (c) llevar a cabo la reacción de amplificación.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es ácido ribonucleico, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el ácido ribonucleico diana con una mezcla de reacción de amplificación que contiene al menos un primer oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que el primer oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un primer compuesto químico y un primer intervalo de temperatura;
 - (b) incubar la mezcla de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la transcripción inversa del ácido ribonucleico;
 - (c) exponer la mezcla de la etapa (b) a dicho primer compuesto químico y dicho primer intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo del primer oligonucleótido modificado reversiblemente; y
 - (d) llevar a cabo la reacción de amplificación para formar productos de extensión del cebador.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la mezcla de reacción de amplificación comprende además al menos un segundo oligonucleótido modificado reversiblemente, en el que el segundo oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un extremo 3' distinto de un grupo hidroxilo que puede convertirse en un extremo 3' hidroxilo después de exposición a un segundo compuesto químico y un segundo intervalo de temperatura; y en el que el método comprende además una etapa de exposición de la mezcla de la etapa (a) a dicho segundo compuesto químico y dicho segundo intervalo de temperatura durante un tiempo suficiente para regenerar el extremo 3' hidroxilo del segundo oligonucleótido modificado reversiblemente antes de la etapa (b).
5. El método de la reivindicación 3, que es un proceso de RT-PCR en una etapa con un sistema de dos enzimas, en el que al menos se usan una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa termoestable, o con un sistema de una enzima, en el que sólo se usa una enzima que funciona tanto como transcriptasa inversa como ADN polimerasa.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un grupo éster de ácido carboxílico en su extremo 3', el éster de ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en éster de formato, éster de benzoilformato, éster de haloacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmetoxiacetato, éster de fenoxiacetato, éster de maleato y sus derivados, éster de succinato y sus derivados, éster de 4-oxopentanoato, éster de pivaloato, éster de crotonato, éster de 4-metoxicrotonato y 3-fenilpropionato.
7. El método de la reivindicación 6, en el que para regenerar el grupo hidroxilo en 3' se usa un compuesto químico en combinación con incubación a un intervalo de temperatura, el compuesto químico se selecciona del grupo que consiste en azida, imidazol, piridina, hidroxilamina, hidrazina e hidróxido de tetrabutilamonio.
8. El método de la reivindicación 6, en el que el éster de ácido carboxílico es éster de ácido maleico y se usa hidroxilamina o hidrazina para regenerar el grupo hidroxilo en 3' después de incubación a un intervalo de temperatura.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un grupo éter de sililo, que se selecciona del grupo que consiste en éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de triisopropilsililo, éter de dimetilisopropilsililo, éter de dietilisopropilsililo, éter de dimetilhexilsililo, éter de t-butildimetilsililo, éter de t-butildifenilsililo, éter de tribencilsililo, éter de tri-p-xililsililo, éter de trifenilsililo, éter de difenilmetilsililo y éter de t-butilmetoxifenilsililo, en su extremo 3'.

10. El método de la reivindicación 9, en el que se usa un fluoruro, que se selecciona del grupo que consiste en fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, fluoruro de litio y ácido fluorhídrico para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
- 5 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el oligonucleótido modificado reversiblemente tiene un grupo éter en su extremo 3', el éter se selecciona del grupo que consiste en éter de tetrahidrofurano, éter de alilo, éter de p-metoxifenilo, éter de p-metoxibencilo, éter de 3,4-dimetoxibencilo, éter de (4-metoxifenoxi)metilo, éter de metoxietoximetilo, éter de metoximetilo, éter de guayacolmetilo, éter de tetrahidropirano, éter de tetrahidrotiofurano, éter de siloximetilo o éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo, éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo y éter de metilo.
- 10 12. El método de la reivindicación 11, en el que el éter es éter de alilo y se usa un catalizador de paladio o rodio para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
13. El método de la reivindicación 11, en el que el éter es éter de p-metoxifenilo o p-metoxibencilo o éter de 3,4-dimetoxibencilo o éter de (4-metoxifenoxi)metilo y se usa nitrato cérico amónico para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
- 15 14. El método de la reivindicación 11, en el que el éter se selecciona del grupo que consiste en éter de metoxietoximetilo, éter de metoximetilo, éter de guayacolmetilo, éter de tetrahidropirano y éter de tetrahidrotiofurano y se usa un catalizador ácido de Lewis para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
15. El método de la reivindicación 11, en el que el éter es éter de siloximetilo o éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo y se usa fluoruro para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
- 20 16. El método de la reivindicación 11, en el que el éter es éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo y se usa LiBF_4 y/o fluoruro para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
17. El método de la reivindicación 11, en el que el éter es éter de metilo y se usa uno o más compuestos químicos seleccionados del grupo que consiste en BBr_3 , SiCl_4 , NaI y AlX_3 para regenerar el grupo hidroxilo en 3'.
- 25 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en ensayo invasor, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa, amplificación con círculo rodante, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico, replicación de secuencia auto-sostenible, amplificación isotérmica con un único cebador, amplificación isotérmica con un único cebador exponencial o amplificación mediada por bucle.

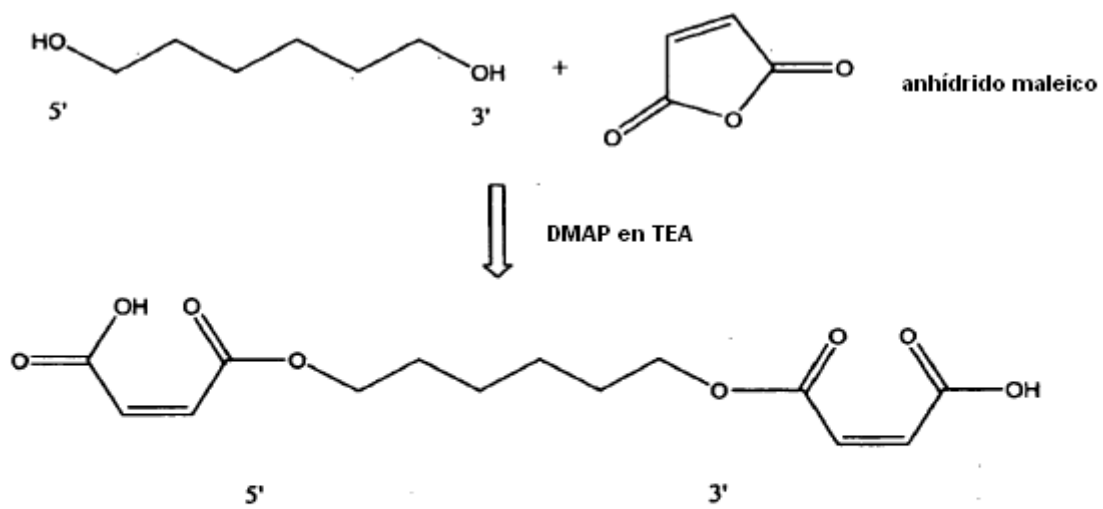


Figura 1

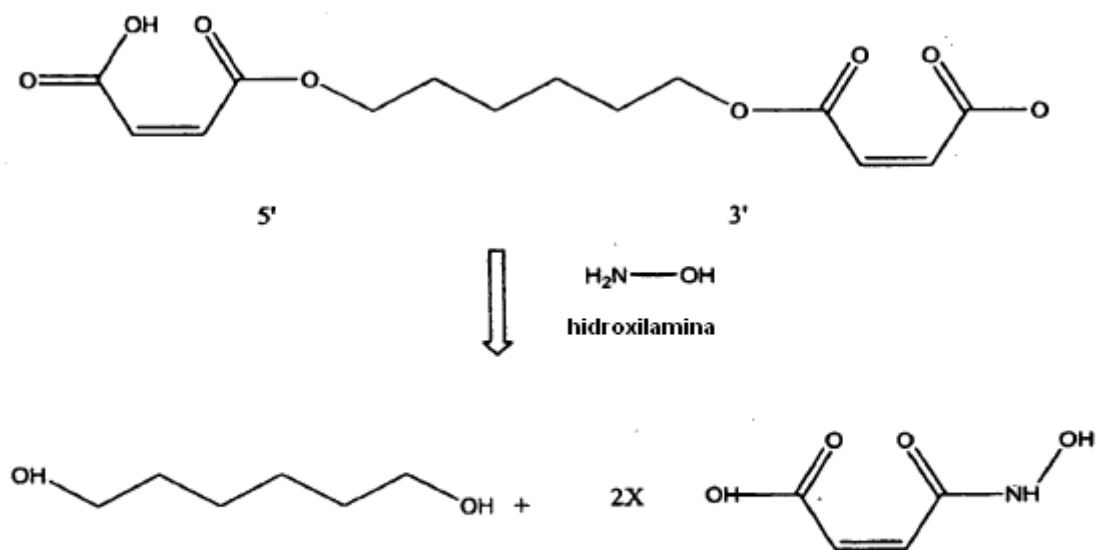


Figura 2

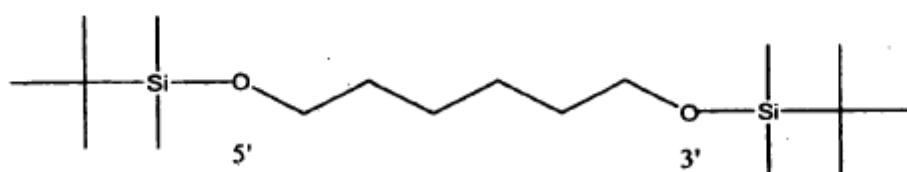
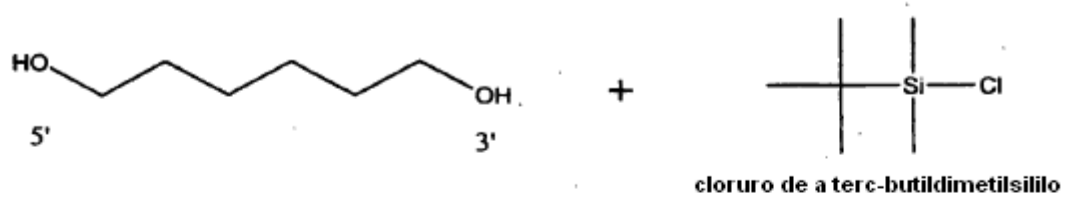


Figura 3

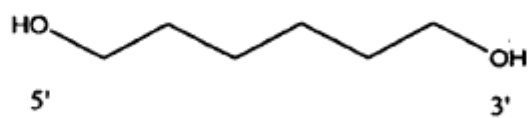
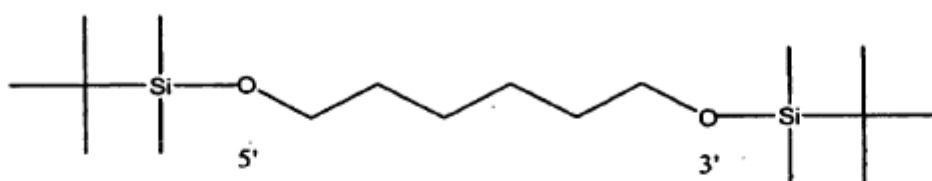


Figura 4

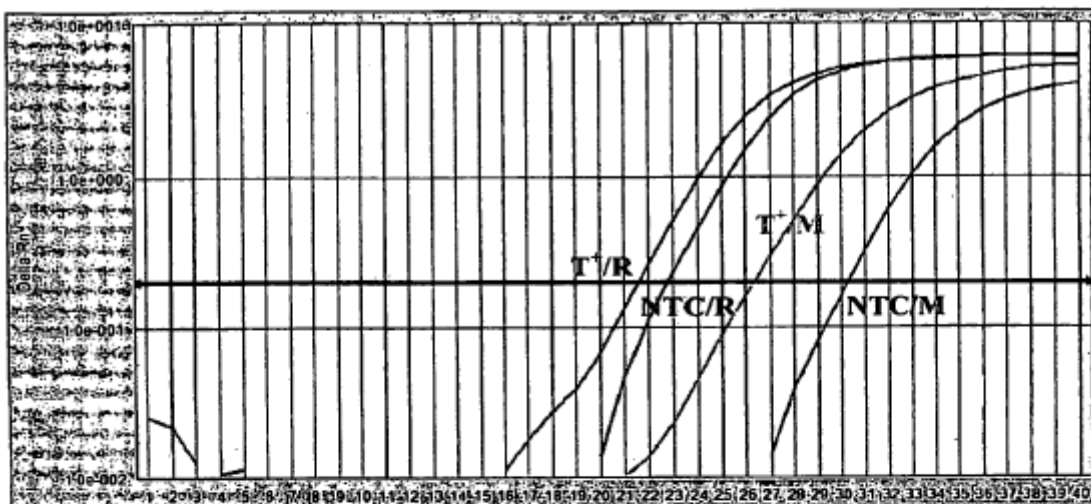


Figura 5a

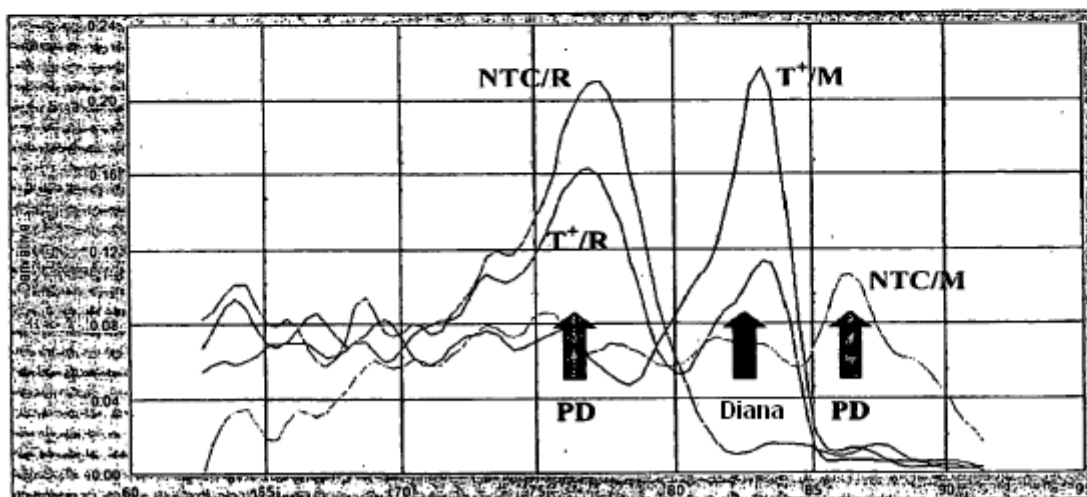


Figura 5b

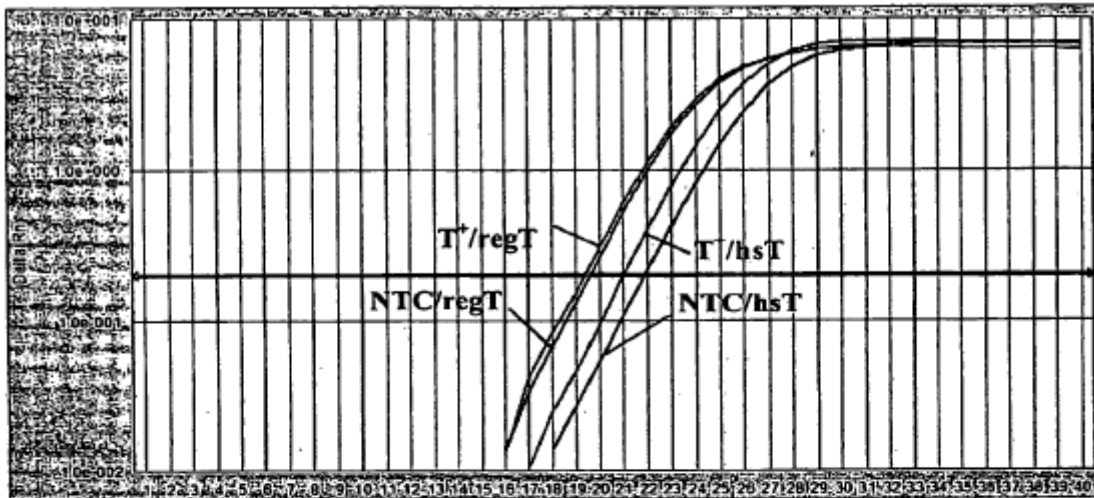


Figura 6a

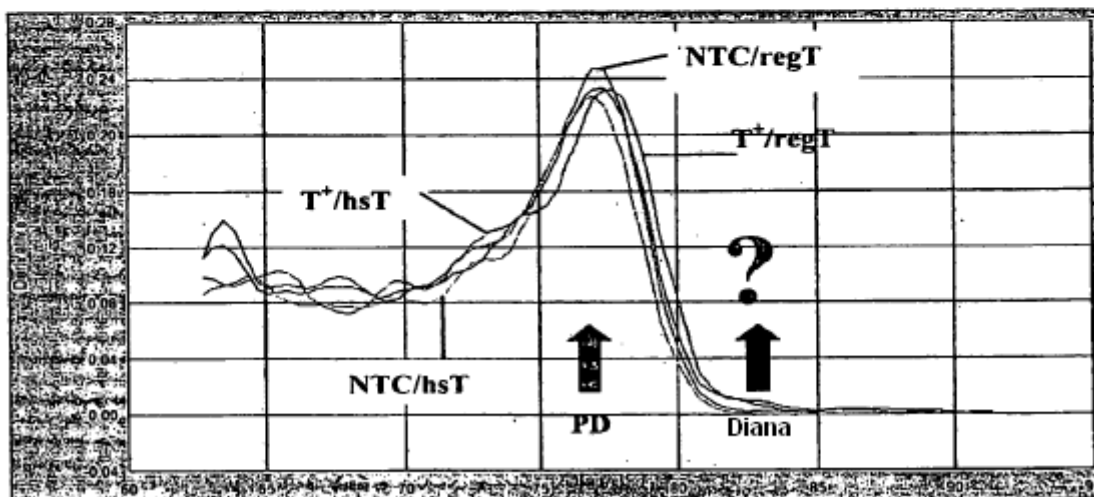


Figura 6b

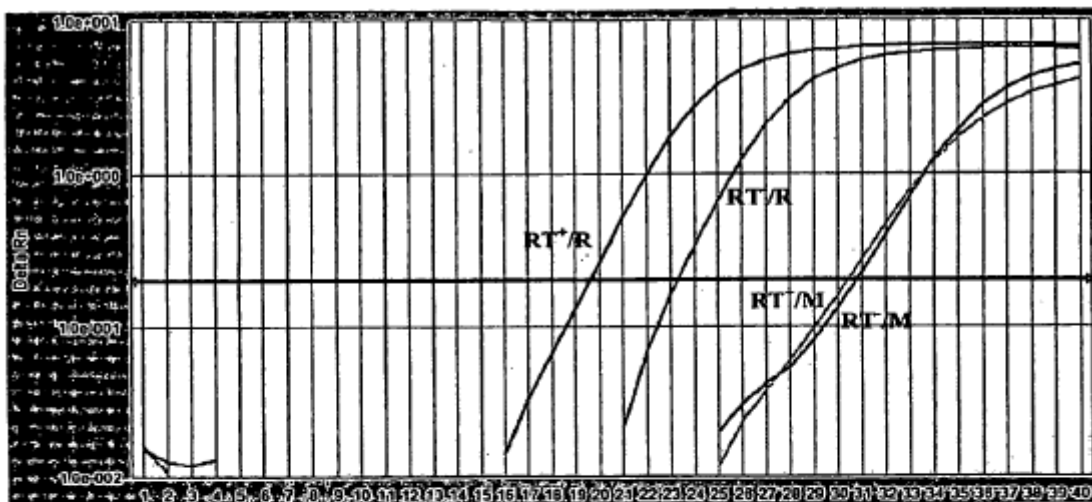


Figura 7

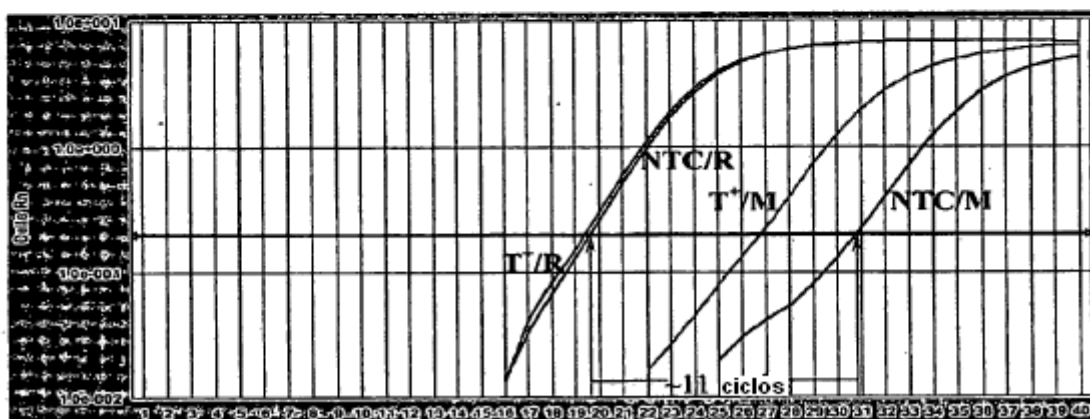


Figura 8a

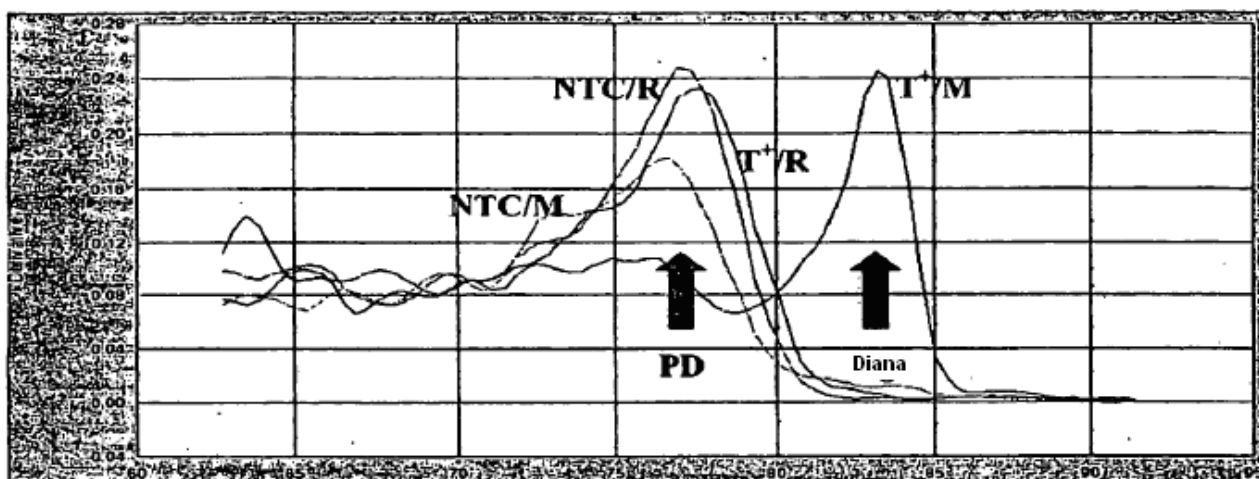


Figura 8b

Multiplex	#Cebadores	#Amplicones	#PDs
1	2	1	1
2	4	2	6
3	6	3	15
4	8	4	28
5	10	5	45
6	12	6	66
7	14	7	91
8	16	8	120
9	18	9	153
10	20	10	190

Tabla 1