

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 375**

51 Int. Cl.:
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03707624 .7**
96 Fecha de presentación: **31.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1476561**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

54 Título: **Amplificación de secuencias repetitivas de ácido nucleico**

30 Prioridad:
31.01.2002 US 353591 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF UTAH
TECHNOLOGY TRANSFER OFFICE, SUITE NO.
110, 615 ARAPEEN DRIVE
SALT LAKE CITY, UTAH 84108, US**

72 Inventor/es:
CAWTHORN, Richard

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 379 375 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

Amplificación de secuencias repetitivas de ácido nucleico.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere al campo de la tecnología de ADN recombinante. Específicamente, la presente invención está dirigida a composiciones y métodos para amplificar ácidos nucleicos diana, especialmente amplificación directa de secuencias repetitivas de ácido nucleico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La detección de la presencia de ácidos nucleicos diana es vital en numerosas aplicaciones en el diagnóstico médico, medicina forense, análisis genético y salud pública. Por ejemplo, la identificación de secuencias de ADN específicas es crítica para el diagnóstico de trastornos hereditarios, la determinación de la susceptibilidad a enfermedades y la identificación de agentes causales de enfermedades infecciosas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona un método altamente sensible para detectar la presencia de ácidos nucleicos diana por la amplificación selectiva de ácidos nucleicos diana. El método se basa en el uso de cebadores oligonucleotídicos que hibridan con extremos opuestos de un segmento de ácido nucleico diana, un amplicón y la copia cebada del segmento del ácido nucleico por una polimerasa. Los ciclos reiterativos de síntesis de ADN, desnaturalización y rehibridación permiten la amplificación exponencial de un ácido nucleico diana dado.

15 La selección de los cebadores es un determinante principal en el éxito o fracaso de la reacción de amplificación. Los factores críticos incluyen la longitud del cebador, temperatura de fusión (T_m), especificidad de secuencia, secuencias complementarias del cebador, contenido G/C y secuencia de la región 3'-terminal. En general, los cebadores deben hibridar con especificidad con el ácido nucleico diana pero no deben hibridar con ni amplificar secuencias de ácido nucleico no diana.

20 La amplificación de ácidos nucleicos no diana se vuelve problemática cuando el extremo 3' de un cebador es complementario con otro cebador. Estos cebadores tenderán a hibridar entre sí, que entonces se extienden por la polimerasa para formar productos "dímero de cebador". La amplificación posterior de dímeros de cebador da lugar a la depleción de cebadores, lo que resulta en una sensibilidad reducida o incluso fracaso de la amplificación del ácido nucleico diana pretendido. La realización de las extensiones de cebador o hibridación preamplificación a temperaturas que limitan los híbridos cebador-cebador (por ejemplo, PCR de "arranque en caliente", D'Aquila, R.T. et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 3749 (1991), PCR "touchdown", Don, R.H. et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 4008 (1991)) o el ajuste de los componentes tamponadores para incrementar la astringencia de la hibridación puede minimizar la interferencia de los dímeros de cebador. Sin embargo, la presencia de cebadores en exceso durante las reacciones de PCR permite que incluso una débil complementariedad en la región 3' terminal genere estos productos secundarios de interferencia.

25 Aunque la elección de diferentes regiones del ácido nucleico diana para seleccionar cebadores proporciona una base para limitar las amplificaciones no dependientes de ácidos nucleicos diana, las restricciones en la selección de secuencias para generar cebadores pueden limitar la elección de diseños de cebador alternativos. Por ejemplo, la amplificación directa de secuencias cortas repetitivas en tándem tales como repeticiones de telómero es difícil porque los cebadores para estas secuencias siempre tendrán algún grado de complementariedad. Estas secuencias repetitivas no permiten normalmente una elección de secuencias de cebador para limitar la formación de productos dímeros de cebador. Consecuentemente, los métodos actuales para estimar las longitudes de telómero se basa en la digestión con enzimas de restricción del ADN genómico seguido de la hibridación con secuencias repetitivas (análisis de fragmento de restricción terminal; véase Harley, C.B. et al., *Nature* 345: 458-460 (1990)), amplificación indirecta de repeticiones usando secuencias únicas situadas fuera de la región de repetición (véase Kozlowski, M.R. et al., Patente EEUU No. 5.741.677), hibridación in situ con fluorescencia (véase Henderson, S.J. *Cell Biol.* 134: 1-12 (1996)) o métodos de citometría de flujo (véase Hultdin, M. *Nucleic Acids Res.* 26: 3651-3656 (1998)). Generalmente, estos procedimientos son largos o requieren cantidades sustanciales de ADN. Como el número de copias de las repeticiones teloméricas y otras secuencias repetitivas en tándem en una célula se correlaciona con los estados fisiológicos o patológicos de una célula, existe una necesidad de composiciones y métodos para amplificar y cuantificar rápidamente estas secuencias a la vez que se evitan generalmente las reacciones secundarias de dímeros de cebador competitivos durante la amplificación.

30 Tatematsu et al (*Oncogene* (1996) 13: 2265-2274) y JP 9206081 describen un método nuevo basado en PCR para medir la actividad telomerasa y muestran que este método es útil para el análisis cuantitativo de la telomerasa humana. Los complejos cebador/cebador formados entre los cebadores de PCR directos e inversos usados en este método tenían un emparejamiento erróneo de un par de bases en los extremos 3', evitando de esta manera la producción de productos de PCR derivados de este complejo. Además, se introdujeron secuencias "etiqueta" extra no relacionadas en los extremos

5' de los cebadores de PCR. El molde de partida en estas dos descripciones es un ADN monocatenario formado por una telomerasa y el primer cebador.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Según los objetos resaltados anteriormente, la presente invención proporciona métodos para amplificar ácidos nucleicos diana a la vez que se limitan las amplificaciones no dependientes de ácido nucleico diana. Una realización preferida, proporciona un método para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana humano que comprende:

10 a) poner en contacto un ácido nucleico diana que comprende primera y segunda cadenas sustancialmente complementarias con un primer y un segundo cebador, en el que dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dichos cebadores hibridados son capaces de extensión de cebador cuando hibridan con sus cadenas respectivas, y en el que al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un emparejamiento erróneo de un par de bases entre dicho primer cebador y un nucleótido en dicha unidad repetitiva cuando dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena, en el que dicho primer cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí, en el que al menos un nucleótido en dicho segundo cebador produce un emparejamiento erróneo de un par de bases entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dicho segundo cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho primer cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí; y

b) amplificar el ácido nucleico diana por la reacción en cadena de la polimerasa.

25 En una realización preferida para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva, el primer cebador hibrida con más de una unidad repetitiva de la primera cadena y el segundo cebador hibrida con más de una unidad repetitiva de la segunda cadena del ácido nucleico diana. Los residuos de nucleótidos del primer y segundo cebadores se alteran para producir emparejamientos erróneos entre los residuos alterados y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótidos idéntica de cada unidad repetitiva de la primera y segunda cadena respectivamente.

30 En una realización preferida, la presente invención proporciona métodos para determinar el número de unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana, tales como telómeros, midiendo la cantidad de ácidos nucleicos diana amplificados. Estos métodos encuentran aplicaciones en el diagnóstico del cáncer y la evaluación de la senescencia celular.

Según los métodos descritos, la presente invención proporciona además composiciones para, y el uso de éstas en, métodos para amplificar los ácidos nucleicos sujeto diana, incluyendo regiones teloméricas repetitivas.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

35 La Figura 1 representa la secuencia de los pares de cebadores oligonucleotídicos tel 1 y tel 2, usados para amplificar unidades teloméricas repetitivas humanas. Se muestran los esquemas de hibridación de los cebadores con las secuencias teloméricas repetitivas y la hibridación de los cebadores entre sí. El cebador tel-1 puede hibridar con cualquier cadena de 31 pares de bases complementaria disponible a lo largo de la cadena de ADN telomérico orientada 5' a 3' hacia el centrómero. El cebador tel 2 puede hibridar con cualquier cadena de 33 pares de bases complementaria a lo largo de la cadena orientada 5' a 3' hacia el extremo del cromosoma. Para cada cebador, los residuos de nucleótidos se alteran para producir emparejamientos erróneos entre el residuo alterado y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótido idéntica de cada unidad repetitiva con la que hibrida el cebador. Así, para tel 1 y tel 2, cada sexta base está emparejada erróneamente. Para limitar los productos de dímero de cebador, los residuos alterados de cada cebador también producen un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido 3' terminal del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí, bloqueando así la extensión por la polimerasa. Además, las regiones 5' terminales del cebador se diseñan de manera que no haya emparejamiento de pares de bases con las repeticiones teloméricas. Estas secuencias de la región 5' terminal no complementarias evitan que los extremos 3' de los productos de PCR inicien la síntesis de ADN en el medio de los productos de amplificación teloméricos. Mediante el diseño de los cebadores específicos de telómero que tienen un contenido GC similar, y por lo tanto T_m s similar (véase el Ejemplo 1), se reducen más las amplificaciones no deseadas.

50 La Figura 2 muestra curvas estándar usadas para medir las proporciones relativas T/S, en la que la proporción T/S es la proporción de telómero (T) respecto al gen de copia única (S) (véase el Ejemplo 2). Se generaron cinco concentraciones de ADN en un intervalo de ocho veces por dilución seriada (factor de dilución~1,68) y se alicuotaron en pocillos de placa de microtitulación; las cantidades finales por pocillo variaron de 12,64 ng a 100 ng, con la cantidad media siendo

aproximadamente equivalente a la de las muestras que se ensayan. La Ct de una muestra de ADN es el número fraccionario de los ciclos de PCR a los que debe someterse la muestra con el fin de acumular suficiente producto para cruzar un umbral fijado de magnitud de señal de fluorescencia. Cualquier muestra de ADN humano individual o combinada puede usarse para crear las curvas estándar, siempre que cada Ct de muestra ensayada esté en el intervalo de C_t s de las curvas estándar (O = gen de copia única 36B4; Δ = telómero).

La Figura 3 muestra la correlación de las proporciones relativas T/S determinada por PCR cuantitativa en tiempo real usando los cebadores descritos en la presente memoria y las longitudes medias del fragmento de restricción telomérico (TRF) determinadas por análisis de hibridación Southern tradicional. Las muestras de ADN usadas para el análisis fueron de sangre extraída de 21 individuos. Todas las proporciones relativas T/S representadas tienen valores $\geq 1,0$ porque las proporciones T/S iniciales determinadas usando las curvas estándar se habían normalizado respecto a la proporción T/S más baja (0,69) observada entre las muestras. Se muestra la ecuación para la línea de regresión lineal que mejor ajusta los datos.

La Figura 4 muestra los productos de la amplificación separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con tinción de bromuro de etidio e iluminación UV. Después de 25 ciclos de PCR, el ADN telomérico humano amplificado aparece como una mancha con la mayor intensidad empezando a aproximadamente 76 pares de bases y desvaneciéndose progresivamente hasta el fondo alrededor de 400 pares de bases (ADN genómico humano). También se obtiene una mancha de productos empezando aproximadamente en 76 pares de bases cuando se usa en la amplificación un molde de ácido nucleico diana que contiene un número conocido de unidades teloméricas repetitivas humanas, (TTAGGG)₂₀. Cuando se omite el ADN genómico humano (es decir, tampón) o se reemplaza por ADN de *E. coli*, no se detecta ningún producto hasta 25 ciclos de PCR. Se muestran los estándares de longitud de ADN (escalera 123 pb).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y composiciones útiles para amplificar ácidos nucleicos diana a la vez que se limitan las reacciones de amplificación no dependientes de ácidos nucleicos diana. Específicamente, la presente invención proporciona cebadores que limitan la amplificación de cebadores que hibridan entre sí mientras que permite la amplificación del ácido nucleico diana. Los cebadores de la presente invención comprenden residuos de nucleótidos alterados o mutados de manera que cuando los cebadores hibridan entre sí, el residuo 3' terminal de un cebador forma un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido alterado o mutado en el otro cebador, evitando así la extensión del cebador. La presente invención encuentra uso en la reducción del fondo de PCR y para amplificar y cuantificar secuencias repetitivas, especialmente secuencias teloméricas repetitivas.

Por "cebador", "ácido nucleico cebador", "cebador oligonucleotídico" o equivalentes gramaticales tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un ácido nucleico que hibridará con alguna parte del ácido nucleico diana. Los cebadores de la presente invención se diseñan para ser sustancialmente complementarios con una secuencia diana de manera que ocurra la hibridación de la secuencia diana y los cebadores de la presente invención y el emparejamiento de bases 3' apropiado permite que tenga lugar la extensión del cebador. Dicha complementariedad no necesita ser perfecta. Así, por "complementario" o "sustancialmente complementario" se quiere decir en la presente memoria que las sondas son los suficientemente complementarias con las secuencias diana como para hibridar bajo condiciones de reacción normales. Las desviaciones de la complementariedad perfecta son permisibles siempre que las desviaciones no sean suficientes para excluir completamente la hibridación. Sin embargo, si el número de alteraciones o mutaciones es suficiente de manera que no pueda ocurrir hibridación bajo las condiciones de hibridación menos astringentes, como se define más adelante, la secuencia no es una secuencia diana complementaria.

Los cebadores de la presente invención comprenden ácidos nucleicos. Por "ácido nucleico" o "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales se quiere decir en la presente memoria al menos dos nucleótidos unidos entre sí covalentemente. Un ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener núcleos alternativos, que comprenden por ejemplo, fosforamida (Beaucage, S.L. et al., Tetrahedron 49: 1925-1963 (1993) y referencias en éste; Letsinger, R.L. et al., J. Org. Chem. 35: 3800-3803 (1970); Sprinzl, M. et al., Eur. J. Biochem. 81: 579-589 (1977); Letsinger, R.L. et al., Nucleic Acids Res. 14: 3487-3499 (1986); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984); Letsinger, R.L. et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); y Pauwels et al., Chemica Scripta 26: 141-149 (1986)), fosforotioato (Mag, M. et al., Nucleic Acids Res. 19: 1437-1441 (1991); y Pat. EEUU No. 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989)), uniones O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, F., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1991) y núcleos y uniones de ácido nucleico peptídico (Egholm, M. Am. Chem. Soc. 114: 1895-1897 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008 (1992); Egholm, M Nature 365: 566-568 (1993); Carlsson, C et al., Nature 380: 207 (1996)). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con núcleos positivos (Dempcy, R.O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097-6101 (1995)); núcleos no iónicos (Pat. EEUU Nos. 5.386.023; 5.637.684; 5.602.240; 5.216.141; y 4.469.863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. (Ed. Inglés) 30: 423 (1991); Letsinger, R.L. et al., J. Am.

Chem. Soc. 110: 4470 (1988); Letsinger, R.L. et al., Nucleoside & Nucleotide 13: 1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34: 17 (1994); Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)) y núcleos no ribosa, incluyendo los descritos en la Patente EEUU No. 5.235.003 y 5.034.506 y en los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos en la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. 169-176 (1995)).

En una realización preferida, los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que incluyen análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Estos núcleos son sustancialmente no iónicos bajo condiciones neutras, a diferencia del núcleo fosodiéster altamente cargado de los ácidos nucleicos naturales. Esto tiene como resultado varias ventajas. El núcleo PNA presenta una cinética de hibridación mejorada. Los PNA tienen grandes cambios en la temperatura de fusión (T_m) para pares de bases emparejadas erróneamente frente a las perfectamente emparejadas. El ADN y el ARN presentan típicamente una caída de $2-4^{\circ}\text{C}$ en la T_m para un emparejamiento erróneo interno mientras que con el núcleo de PNA no iónico, la caída está cerca de $7-9^{\circ}\text{C}$. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estos núcleos es relativamente insensible a la concentración de sal. Se prefieren particularmente los derivados de PNA que son extendibles por una polimerasa. Estos cebadores comprenden oligómeros de PNA con un nucleótido unido que es reconocido y extendido por una polimerasa (véase Lutz, M.J. et al., Nucleosides Nucleotides 18: 393-401 (1999) y Misra, H.S. Biochemistry 37: 1917-1925 (1998)). Los PNA con un nucleótido o dinucleótido 3' terminal son reconocidos y extendidos por varias polimerasas y la presencia del segmento de PNA hará que la cadena modificada con PNA sea resistente a nucleasa, particularmente una exonucleasa 5'-3'.

Aunque los cebadores son generalmente monocatenarios, los ácidos nucleicos como se describen en la presente memoria pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, o contener partes de secuencia tanto bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o híbrido, en el que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxiribo y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, inosina, etc., aunque se prefieren las bases que aparecen generalmente. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nucleósido" incluye nucleótidos así como análogos de nucleósido y nucleótido y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas no naturales. Así, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico (PNA), cada una conteniendo una base, se refieren en la presente memoria como un nucleótido.

Como apreciarán los expertos en la técnica, todos estos análogos de ácido nucleico pueden encontrar uso en la presente invención. Además, pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos o mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos.

El tamaño del ácido nucleico cebador puede variar, como apreciarán los expertos en la técnica, en general varía de una longitud de 5 a 500 nucleótidos, prefiriéndose los cebadores de entre 10 y 100, prefiriéndose particularmente entre 12 y 75 y prefiriéndose especialmente de 15 a 50, dependiendo del uso, especificidad requerida y la técnica de amplificación.

Generalmente, las composiciones de la presente invención proporcionan un primer cebador que hibrida con una primera cadena única del ácido nucleico diana y un segundo cebador que hibrida con una segunda cadena única del ácido nucleico diana, en el que la primera y segunda cadenas son sustancialmente complementarias. Los cebadores son capaces de extensión de cebador por una polimerasa cuando hibridan con sus cadenas respectivas. Esto es, los cebadores hibridados con el ácido nucleico diana tienen sus residuos de nucleótidos 3' terminales que con complementarios con el residuo de nucleótido del ácido nucleico diana de manera que los cebadores son capaces de extensión de cebador.

Al menos uno de los cebadores comprende además al menos un residuo de nucleótido alterado o mutado, lo que produce un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado y el nucleótido 3' terminal del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí. Por residuo de nucleótido "alterado", "cambiado" o "mutado", se quiere decir en la presente memoria cualquier cambio en el residuo de nucleótido del cebador, tal como transversiones y transiciones, para generar el emparejamiento erróneo requerido. La presencia de un emparejamiento erróneo en el nucleótido 3' terminal bloquea la extensión por la polimerasa, limitando así las reacciones de extensión no dependientes de ácido nucleico diana.

Consecuentemente, al menos un nucleótido del primer cebador se altera para producir un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado y el residuo de nucleótido 3' terminal del segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí.

Para cualquier par de cebadores, la capacidad de los cebadores de hibridar entre sí puede examinarse alineando la secuencia del primer cebador con el segundo cebador. La estabilidad de los híbridos, especialmente la temperatura de fusión térmica (T_m) puede determinarse por los métodos descritos más adelante y por métodos muy conocidos en la técnica. Éstos incluyen, pero no están limitados a, cálculos termodinámicos del vecino más próximo (véase Breslauer, T.

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8893-8897 (1986); Wetmur, J.G. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-259 (1991); Rychlik, W. et al., J. NIH. Res. 6: 78 (1994)); estimaciones de la Regla de Wallace (Suggs, S.V. et al., "Use of Synthetic oligodeoxiribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences", Developmental biology using purified genes, D.B. Brown, ed., p 683-693, Academic Press, Nueva York, 1981) y estimaciones de la T_m basadas en Bolton y McCarthy (véase Baldino, F.J. et al., Methods Enzymol. 168: 761-777 (1989); Sambrook, J, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Capítulo 10, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). El efecto de varios parámetros incluyendo, entre otros, fuerza iónica, longitud de la sonda, contenido G/C y emparejamientos erróneos se toman en consideración cuando se evalúa la estabilidad de los híbridos. La consideración de estos factores es muy conocida para los expertos en la técnica (Sambrook, J., *supra*).

10 La posibilidad de que los híbridos formados entre los cebadores sean capaces de extensiones no dependientes de molde por la polimerasa se evalúa por la presencia de complementariedad en las regiones 3' terminales de los híbridos. Aquellos híbridos capaces de ser extendidos por la polimerasa tienen al menos el nucleótido 3' terminal de al menos uno de los cebadores complementario a la secuencia de nucleótidos del otro cebador (Watson, R. *Amplifications* 5-6 (1989)). Así, los híbridos que comprenden complementariedad de al menos el nucleótido 3' terminal de al menos uno de los
15 cebadores se seleccionan para alteración o mutación de las secuencias de cebador. Como la extensión de cebador por la polimerasa es menos eficaz cuando hay un emparejamiento erróneo cerca del nucleótido 3' terminal, se prefieren las alteraciones para los híbridos de cebador con al menos 2 o más nucleótidos y lo más preferiblemente para híbridos con 3 o más nucleótidos complementarios en la región 3' terminal. La identificación de los híbridos con complementariedad en las regiones 3' terminales también puede hacerse usando varios algoritmos, por ejemplo, el programa informático
20 Amplify 1.2 (Universidad de Wisconsin, Departamento de Genética, Madison, WI).

Alternativamente, la presencia de productos de extensión de cebador no dependientes de ácido nucleico diana se evalúa fácilmente realizando reacciones de amplificación en ausencia del ácido nucleico diana y examinando los productos para especies dímero de cebador, por ejemplo, por electroforesis. Por "dímero de cebador" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir extensiones no dependientes de ácido nucleico diana por la polimerasa que surgen a partir de
25 cebadores hibridados con otros cebadores. La presencia de productos dímero de cebador también puede evaluarse realizando la reacción de amplificación en ausencia o presencia del ácido nucleico diana y analizando las curvas de fusión de los productos de la amplificación (véase Ririe, K.M. Anal. Biochem. 245: 154-160 (1997)).

En una realización preferida, el residuo de nucleótido alterado o mutado está lo suficientemente distanciado del extremo 3' terminal del cebador como para permitir la extensión eficaz por la polimerasa cuando los cebadores hibridan con sus cadenas respectivas del ácido nucleico diana. Como es muy conocido que los emparejamientos erróneos en o cerca del nucleótido 3' terminal pueden interferir con la extensión del cebador, el residuo de nucleótido alterado está al menos 1 o más residuos del nucleótido 3' terminal del cebador alterado. Más preferiblemente, el residuo alterado está al menos 2 o más residuos, mientras que en la realización más preferida, el residuo alterado está al menos 3 o más residuos del nucleótido 3' terminal.

35 Los dos cebadores usados en la reacción de amplificación comprenden al menos un residuo de nucleótido alterado de manera que la hibridación de los cebadores entre sí genera emparejamientos erróneos en los residuos 3' terminales de ambos cebadores para evitar la extensión por la polimerasa. Esta situación surge cuando cada uno de los cebadores tiene regiones 3' terminales complementarias con el otro cebador. Así, en una realización preferida, además de al menos un residuo de nucleótido alterado en el primer cebador, al menos un residuo de nucleótido en el segundo cebador se altera para producir un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado en el segundo cebador y el nucleótido 3'
40 terminal del primer cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí. Como se ha discutido anteriormente, el residuo alterado está preferiblemente al menos 1 residuo de nucleótido, más preferiblemente al menos 2 residuos de nucleótidos y lo más preferiblemente al menos 3 residuos de nucleótidos del nucleótido 3' terminal del segundo cebador. Como los residuos de nucleótidos 3' terminales del primer y segundo cebadores no están alterados, permanecen capaces de ser extendidos por la polimerasa cuando los cebadores hibridan con sus cadenas respectivas del ácido nucleico diana. Consecuentemente, los ácidos nucleicos diana se amplifican fácilmente mientras que los productos de ácido nucleico no diana no se amplifican.

Aunque las realizaciones descritas anteriormente se refieren a dos cebadores diferentes capaces de hibridar entre sí, hay circunstancias en las que un cebador será complementario a sí mismo, lo que resulta en productos de dímero de cebador de un único cebador. Así, la presente invención no está limitada a cebadores diferentes sino que también es aplicable a cebadores auto-complementarios que dan lugar a productos de dímero de cebador en las reacciones de
50 amplificación.

A la vista del diseño general de los cebadores para limitar las amplificaciones no dependientes de ácido nucleico diana, la presente invención proporciona además composiciones útiles para amplificar una pluralidad de unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana. Por "unidad repetitiva", "unidad de repetición", "elemento repetitivo" o equivalentes gramaticales tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una secuencia de nucleótidos
55

mínima que está reiterada o repetida en la región repetitiva. La unidad repetitiva para la amplificación puede comprender cualquier secuencia repetitiva, prefiriéndose las unidades repetitivas de 1 o más nucleótidos, más preferiblemente unidades repetitivas entre 3 y 100 nucleótidos y lo más preferiblemente unidades repetitivas entre 4 y 30 nucleótidos. En general, estas unidades repetitivas están organizadas en forma de tándem, aunque pueden estar presentes nucleótidos no repetitivos entre las unidades repetitivas. Por "pluralidad" de elementos repetitivos se quiere decir en la presente memoria al menos dos o más unidades repetitivas en la región repetitiva. Las regiones repetitivas pueden comprender aquellas que existen en la naturaleza, tal como las regiones repetitivas que comprenden centrómeros y telómeros, o pueden comprender regiones repetitivas introducidas en las células y organismos, por ejemplo, por transfección, recombinación o integración específica de sitio (por ejemplo, administración retroviral). El número de unidades repetitivas amplificadas para cada conjunto de cebadores dependerá de la longitud del cebador y de la longitud de nucleótidos de la unidad repetitiva. Como apreciarán los expertos en la técnica, las secuencias del cebador y las longitudes del cebador pueden elegirse tomando como base la estabilidad y especificidad del cebador para las unidades repetitivas.

En una realización preferida, las composiciones para amplificar las unidades repetitivas de una región repetitiva comprenden un primer cebador que hibrida con al menos una unidad repetitiva en una primera cadena única del ácido nucleico diana y un segundo cebador que hibrida con al menos una unidad repetitiva en una segunda cadena única del ácido nucleico diana, en la que la primera y segunda cadenas son sustancialmente complementarias. Los cebadores son capaces de extensión del cebador cuando hibridan con sus respectivas cadenas del ácido nucleico diana. Esto es, los cebadores hibridados con el ácido nucleico diana tienen sus residuos de nucleótidos 3' terminales complementarios al residuo de nucleótido en el ácido nucleico diana de manera que los cebadores son capaces de extensión de cebador. Al menos un residuo de nucleótido de ambos cebadores está alterado para producir emparejamientos erróneos con un residuo de nucleótido de al menos una unidad repetitiva con la que hibrida el cebador, en el que el residuo de nucleótido alterado también produce un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido 3' terminal del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí, limitando así la extensión de cebador de los híbridos cebador-cebador.

Así, al menos un residuo de nucleótido del primer cebador está alterado para producir un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado y un residuo de nucleótido de al menos una unidad repetitiva de la primera cadena con la que hibrida el cebador, en el que el residuo de nucleótido alterado también produce un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido 3' terminal del segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí.

El residuo de nucleótido alterado está preferiblemente al menos 1 residuo de nucleótido, más preferiblemente al menos 2 residuos de nucleótidos y lo más preferiblemente 3 residuos de nucleótidos del nucleótido 3' terminal para permitir una extensión eficaz por la polimerasa cuando el cebador alterado hibrida con los ácidos nucleicos diana.

En la invención, los dos cebadores usados para amplificar unidades repetitivas comprenden al menos un residuo de nucleótido alterado de manera que la hibridación de los cebadores entre sí genera emparejamientos erróneos entre los residuos alterados y los residuos 3' terminales de ambos cebadores. Así, además del residuo de nucleótido alterado en el primer cebador descrito anteriormente, al menos un residuo de nucleótido del segundo cebador está alterado para producir un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado y un residuo de nucleótido de al menos una unidad repetitiva de la segunda cadena con la que hibrida el segundo cebador, en el que el residuo alterado en el segundo cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal del primer cebador cuando los cebadores hibridan entre sí.

En una realización para amplificar unidades repetitivas de una región repetitiva, la presente invención comprende un primer cebador que hibrida con más de una unidad repetitiva en una primera cadena única de un ácido nucleico diana y un segundo cebador que hibrida con más de una unidad repetitiva en una segunda cadena única del ácido nucleico diana, en el que la primera y segunda cadenas son sustancialmente complementarias. Los cebadores son capaces de extensión de cebador cuando hibridan con sus cadenas respectivas del ácido nucleico diana, como se ha descrito anteriormente. En un aspecto, los residuos de nucleótidos de los cebadores están alterados para producir emparejamientos erróneos entre los residuos alterados y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótido idéntica de cada unidad repetitiva de la cadena única del ácido nucleico diana con la que hibrida el cebador. Estos residuos de nucleótidos alterados también producen emparejamientos erróneos con el residuo de nucleótido 3' terminal del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí, limitando así más la extensión de cebador de los híbridos cebador-cebador.

De acuerdo con esto, en una realización preferida, los residuos de nucleótidos del primer cebador están alterados para producir emparejamientos erróneos entre los residuos alterados y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótido idéntica de cada unidad repetitiva de la primera cadena del ácido nucleico diana con la que hibrida el cebador. Estos nucleótidos alterados también producen emparejamientos erróneos con el residuo de nucleótido 3' terminal del segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí.

Los residuos de nucleótidos alterados están preferiblemente al menos 1 residuo de nucleótido, más preferiblemente al menos 2 residuos de nucleótidos y lo más preferiblemente 3 residuos de nucleótidos del nucleótido 3' terminal para permitir una extensión eficaz por la polimerasa cuando el cebador alterado hibrida con los ácidos nucleicos diana.

5 En otro aspecto, los dos cebadores comprenden residuos de nucleótidos alterados de manera que la hibridación de los cebadores entre sí resulta en emparejamientos erróneos del nucleótido 3' terminal de ambos cebadores. Así, en una realización preferida, además de los residuos de nucleótidos alterados en el primer cebador, se alteran los residuos de nucleótidos en el segundo cebador para producir emparejamientos erróneos entre los residuos alterados del segundo cebador y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótido idéntica de cada unidad repetitiva de la segunda cadena con la que hibrida el cebador. Estos nucleótidos alterados del segundo cebador también producen emparejamientos erróneos con el residuo de nucleótido 3' terminal del primer cebador cuando los cebadores hibridan entre sí.

10 Como los cebadores hibridados con los ácidos nucleicos diana deben ser capaces de extensión del cebador, las alteraciones del primer y segundo cebadores deben ser en nucleótidos no complementarios de la unidad repetitiva. Así, en un aspecto, cuando tanto el primer como el segundo cebador comprenden residuos alterados, las alteraciones están en posiciones de nucleótidos adyacentes de la unidad repetitiva. En otro aspecto, las alteraciones están situadas en posiciones de nucleótidos no adyacentes de la unidad repetitiva. En general, los emparejamientos erróneos en posiciones de nucleótidos adyacentes proporcionan el mayor número de residuos emparejados por bases o complementarios entre el nucleótido alterado y el nucleótido 3' terminal, lo que puede ser importante para amplificar eficazmente secuencias repetitivas cortas (es decir, 3-6 pares de bases).

15 En otra realización preferida, el primer y segundo cebadores comprenden además una región 5' terminal que no hibrida (es decir, empareja por bases) con el ácido nucleico diana. La región no emparejada comprende uno o más nucleótidos, con un intervalo preferido de 3 a 60 nucleótidos y un intervalo lo más preferido de 4 a 30 nucleótidos. Cuando los cebadores están dirigidos hacia la amplificación de unidades repetitivas de una región repetitiva, la región no emparejada 5' impide que los extremos 3' de los productos de la extensión de cebador replicados inicien la síntesis del ácido nucleico a partir de las unidades repetitivas internas de los productos de amplificación durante los ciclos posteriores de amplificación.

20 Aunque la región no emparejada 5' terminal puede ser cualquier secuencia que no hibride con el ácido nucleico diana, en una realización preferida la región no emparejada comprende sitios de restricción, secuencias únicas para propósitos de secuenciación o reacciones de extensión de cebador (es decir, amplificación) o secuencias etiqueta para detectar y medir el producto amplificado.

25 En una realización preferida, los cebadores de la presente invención se diseñan para tener T_m s similar. Tal y como se usa en la presente memoria, los cebadores con T_m s similar tienen una diferencia en T_m de aproximadamente 10°C o menos, preferiblemente 5°C o menos y más preferiblemente 2°C o menos. El uso de conjuntos de cebadores (por ejemplo, pares de cebadores) con T_m s similar o idéntica permite el uso de una temperatura de hibridación/extensión óptima para ambos cebadores y proporciona una eficacia de amplificación similar a una condición de amplificación particular. Las ventajas son la capacidad de usar concentraciones similares de cebadores, particularmente a concentraciones menores, lo que limita la generación de productos de amplificación no deseados. Por comparación, cuando las T_m s de los cebadores son diferentes, un cebador se usa a una concentración más alta para compensar las diferencias en la eficacia de la amplificación. Esta concentración más alta de cebador resulta en productos de amplificación no deseables a un número menor de ciclos de PCR.

30 En un aspecto, los cebadores con T_m s similar se preparan alterando la longitud de los cebadores o seleccionando cebadores que tengan un contenido guanosina-citosina (GC) similar. Las T_m s se evalúan por los métodos descritos anteriormente. Tal y como se usa en la presente memoria, un "contenido GC similar" quiere decir un conjunto de cebadores que tiene una diferencia en el contenido GC de aproximadamente 10% o menos, más preferiblemente una diferencia de aproximadamente 5% o menos y lo más preferiblemente una diferencia de aproximadamente 2% o menos, de manera que los cebadores presenten T_m s similares, como se ha definido anteriormente. En el proceso de diseño de los cebadores, la T_m y/o el contenido GC se evalúa inicialmente para la región que hibrida con el ácido nucleico diana. Para los cebadores con una región 5' terminal que no hibrida descritos anteriormente, se realiza un análisis adicional de T_m y del contenido GC para la secuencia de cebador completa. Generalmente, los cebadores se diseñan para tener mayores similitudes en el contenido GC en la región 3' terminal ya que esta región es la se extiende por la polimerasa.

35 Los cebadores de la presente invención pueden usarse para amplificar varios ácidos nucleicos diana. Un único conjunto de cebadores, por ejemplo un par de cebadores, puede usarse para amplificar un único ácido nucleico diana, o múltiples conjuntos de cebadores pueden usarse para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos diana. Las amplificaciones pueden realizarse separadamente para cada único conjunto de cebadores, o en un único recipiente de reacción usando combinaciones de conjuntos de cebadores, conocido generalmente en la técnica como multiplex. Cuando se usan

múltiples conjuntos de cebadores en una única reacción, los cebadores se diseñan para limitar la formación de productos no deseados y limitar la interferencia entre los cebadores de cada conjunto de cebadores.

5 Como la presente invención se refiere a amplificar ácidos nucleicos diana con los cebadores descritos anteriormente, la presente invención proporciona además métodos para amplificar secuencias de ácido nucleico diana. En una realización preferida, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico diana que comprende primera y segunda cadenas sustancialmente complementarias con el primer y segundo cebadores descritos anteriormente y amplificar el ácido nucleico diana con la reacción en cadena de la polimerasa.

10 Por "ácido nucleico diana" o "secuencia diana" o equivalentes gramaticales se quiere decir en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico en un ácido nucleico bicatenario o monocatenario. La secuencia diana puede ser una parte de un gen, una secuencia reguladora, ADN genómico, ADNc, ARN, incluyendo ARNm y ARNr, u otros ácidos nucleicos. Puede tener cualquier longitud, entendiendo que las secuencias más largas son más específicas. En algunas realizaciones, puede ser deseable fragmentar o escindir el ácido nucleico de muestra en fragmentos de 100-10.000 pares de bases, prefiriéndose los fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases en algunas realizaciones. La fragmentación o escisión puede hacerse de varias maneras muy conocidas para los expertos en la técnica., incluyendo métodos mecánicos, químicos y enzimáticos. Así, los ácidos nucleicos pueden someterse a sonicación, prensa de French, cizallamiento o tratarse con nucleasas (por ejemplo, ADNasa, enzimas de restricción, ARNasa, etc.) o agentes de escisión química (por ejemplo, complejos ácido/piperideína, hidrazina/piperidina, hierro/EDTA, complejos 1,10-fenantrolina-cobre, etc.).

20 Como apreciarán los expertos en la técnica, las secuencia diana puede tener muchas formas. Por ejemplo, puede estar contenida en una secuencia de ácido nucleico mayor, es decir, todo o parte de un gen o ARNm, un fragmento de restricción de un ADN plasmídico o genómico, entre otros. La muestra que comprende la secuencia diana puede obtenerse de cualquier tejido de cualquier organismo, incluyendo sangre, cerebro, médula ósea, linfa, hígado, bazo, mama, epitelio (por ejemplo, de la piel, boca, etc.) u otros tejidos, incluyendo los obtenidos por biopsia. Las muestras también pueden comprender excreciones o fluidos corporales, tales como saliva, orina, heces, fluido cerebroespinal, semen, leche, etc. Otras fuentes de ácidos nucleicos diana incluyen bacterias, levaduras, plantas, virus u otros organismos que contienen ácidos nucleicos, patógenos o no patógenos. El ácido nucleico también puede ser cualquier ácido nucleico generado artificialmente por procesos químicos o enzimáticos, tales como reacciones de PCR.

30 La secuencia diana puede prepararse usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, la muestra puede tratarse usando detergentes, sonicación, electroporación, desnaturalizantes, etc., para romper las células, bacterias o virus. Los ácidos nucleicos diana pueden purificarse según se necesite. Los componentes de la reacción pueden añadirse simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier orden como se indica más adelante. Además, puede añadirse una variedad de agentes a la reacción para facilitar la hibridación, amplificación y detección óptimas. Éstos incluyen sales, tampones, proteínas neutras, detergentes, etc. Pueden añadirse otros agentes para mejorar la eficacia de la reacción, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc., dependiendo de los métodos de preparación de la muestra y de la pureza del ácido nucleico diana. Cuando el ácido nucleico diana es ARN, estos ácidos nucleicos pueden convertirse en ADN, por ejemplo por tratamiento con transcriptasa inversa (por ejemplo, transcriptasa inversa MoMuLV, transcriptasa inversa *Tth*, etc.) como es muy conocido en la técnica.

40 Cuando los ácidos nucleicos diana son ácidos nucleicos bicatenarios, se desnaturalizan para generar una primera cadena única y una segunda cadena única de manera que se permite la hibridación de los cebadores. Puede usarse cualquier número de etapas de desnaturalización tales como temperatura a aproximadamente 95°C, aunque pH alcalino, desnaturalizantes (por ejemplo, formamida) y otras técnicas pueden aplicarse según sea apropiado según la naturaleza del ácido nucleico bicatenario.

45 Los cebadores se ponen en contacto con el ácido nucleico diana de manera que un primer cebador es capaz de hibridar con una primera cadena y un segundo cebador es capaz de hibridar con una segunda cadena del ácido nucleico diana. Puede usarse una variedad de condiciones de hibridación para formar los híbridos, incluyendo condiciones de alta, moderada y baja astringencia (véase, por ejemplo, Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, actualizaciones a 2001; todos los cuales se incorporan en la presente memoria por referencia). Las condiciones de astringencia son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, incluyendo la longitud del cebador, número de emparejamientos erróneos, contenido G/C y fuerza iónica. Una guía para la hibridación de ácidos nucleicos se proporciona en Tijssen, P., "Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Assays", en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, 1993). Generalmente, las condiciones astringentes se seleccionan para ser aproximadamente 5-10°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para un híbrido específico a una condición de disolución definida (por ejemplo, fuerza iónica, pH, concentración del ácido nucleico). La T_m se define como la temperatura bajo una condición de disolución definida a la cual el 50% de las secuencias de cebador

complementarias con el ácido nucleico diana han hibridado, o son monocatenarias, en equilibrio. Generalmente, la condición de disolución es las condiciones de disolución usadas para amplificar los ácidos nucleicos diana. Como el grado de astringencia es generalmente la diferencia en la temperatura de hibridación y la T_m , el grado de astringencia puede mantenerse a pesar de cambios en la condición de disolución de la hibridación siempre que la diferencia de la temperatura respecto a T_m se mantenga. Las condiciones de hibridación también pueden variar con el tipo de núcleo de ácido nucleico, por ejemplo núcleo de ácido ribonucleico o ácido nucleico peptídico (PNA).

En la hibridación de los cebadores con los ácidos nucleicos diana y en las reacciones de amplificación, los ensayos se hacen generalmente bajo condiciones de astringencia que permiten la formación de los híbridos en presencia del ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica pueden alterar los parámetros de temperatura, concentración de sal, pH, disolvente orgánico, agentes caotrópicos, u otra variables para controlar la astringencia de la hibridación y minimizar también la hibridación de cebadores con dianas no específicas (por ejemplo, por el uso de PCR de "arranque en caliente" o PCR "touchdown").

Después de poner en contacto los cebadores con los ácidos nucleicos diana, la reacción se trata con una enzima de amplificación, generalmente una polimerasa. En la técnica son muy conocidas varias polimerasas adecuadas, incluyendo, entre otras, polimerasa Taq, Klen Taq, polimerasa Tfl, DynaZyme, etc. Generalmente, aunque todas las polimerasas son aplicables en la presente invención, las polimerasas preferidas son polimerasas termoestables que carecen de actividad exonucleasa 3' a 5' ya que el uso de polimerasas con una actividad exonucleasa 3' a 5' fuerte tiende a eliminar los nucleótidos 3' terminales emparejados erróneamente. También son útiles las polimerasas obtenidas por ingeniería de manera que tengan actividades exonucleasas 3' a 5' reducidas o no funcionales (por ejemplo, Pfu(exo-), Vent(exo-), Pyra(exo-), etc.). También son aplicables las mezclas de polimerasas usadas para extender de manera óptima los cebadores hibridados. En otro aspecto, las enzimas polimerasas útiles para la presente invención se formulan para activarse sólo a temperaturas adecuadas para la amplificación. La presencia de anticuerpos inhibidores de la polimerasa, que se inactivan a temperaturas de amplificación, o el secuestro de las enzimas en una forma que las vuelve no disponibles hasta que se alcanzan las temperaturas de amplificación, también son adecuadas. Estas formulaciones de polimerasa permiten el mezclado de todos los componentes en un único recipiente de reacción a la vez que evitan el cebado de secuencias de ácido nucleico no diana.

En otro aspecto, los expertos en la técnica apreciarán que pueden añadirse varios agentes a la reacción para incrementar la procesividad de la polimerasa, estabilizar la polimerasa frente a la inactivación, disminuir la hibridación no específica de los cebadores o incrementar la eficacia de la replicación. Dichos aditivos incluyen, pero no están limitados a, dimetil sulfóxido, formamida, acetamida, glicerol, polietilén glicol o agentes proteínicos, tales como la proteína de unión a ADN monocatenario de *E. coli*, proteína 32 del gen T4, albúmina de suero bovino, gelatina, etc. En otro aspecto, el experto en la técnica puede usar varios análogos de nucleótido para la amplificación de tipos particulares de secuencias, por ejemplo secuencias ricas en GC o repetidas. Estos análogos incluyen, entre otros, c^7 -dGTP, hidroximetil-dUTP, dITP, 7-deaza-dGTP, etc.

Las reacciones de amplificación se realizan según procedimientos muy conocidos en la técnica. Los procedimientos para la reacción en cadena de la polimerasa se usan y están descritos ampliamente (véase, por ejemplo, la Patente EEUU No. 4.683.195 y 4.683.202). Brevemente, un ácido nucleico bicatenario diana se desnaturaliza, generalmente por incubación a una temperatura suficiente para desnaturalizar las cadenas, y se incuba en presencia de cebadores en exceso, que hibridan (es decir, aparean) con los ácidos nucleicos monocatenarios diana. Una ADN polimerasa extiende el cebador hibridado, generando una nueva copia del ácido nucleico diana. El dúplex resultante se desnaturaliza y se repiten las etapas de hibridación y extensión. Reiterando las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, en presencia de un segundo cebador para la cadena diana complementaria, el ácido nucleico diana englobado por los dos cebadores se amplifica exponencialmente. El tiempo y la temperatura de la etapa de extensión del cebador dependerán de la polimerasa, longitud del ácido nucleico diana que se está amplificando y de la secuencia de cebador empleada para la amplificación. El número de etapas reiterativas requerido para amplificar suficientemente el ácido nucleico diana dependerá de la eficacia de la amplificación para cada ciclo y del número de copias de partida del ácido nucleico diana. Como es muy conocido en la técnica, estos parámetros pueden ajustarse por el experto en la técnica para efectuar un nivel deseado de amplificación. Los expertos en la técnica entenderán que la presente invención no está limitada por variaciones en tiempos, temperaturas, condiciones de tampón y ciclos de amplificación aplicados en el proceso de la amplificación.

Los productos de la amplificación se detectan y analizan por métodos muy conocidos en la técnica. Los productos amplificados pueden analizarse después de separación y/o purificación de los productos, o por medida directa del producto formado en la reacción de amplificación. Los métodos de separación y purificación incluyen, entre otros, electroforesis, incluyendo electroforesis capilar (por ejemplo, en geles de agarosa o acrilamida); cromatografía (por ejemplo, afinidad, tamiz molecular, fase inversa, etc.); e hibridación. Los productos purificados pueden someterse a amplificaciones adicionales como es muy conocido en la técnica. Para la detección, el producto puede identificarse indirectamente con compuestos fluorescentes, por ejemplo con bromuro de etidio o SYBRTMGreen o por hibridación con

sondas de ácido nucleico marcadas. Alternativamente, se usan cebadores marcados o nucleótidos marcados en la reacción de amplificación para marcar el producto de la amplificación. El marcaje comprende cualquier resto detectable, incluyendo marcajes fluorescentes, marcajes radiactivos, marcajes electrónicos y marcajes indirectos tales como biotina o digoxigenina. Cuando se usan marcajes indirectos, se usa un agente de unión secundario que se une al marcaje indirecto para detectar la presencia del producto de la amplificación. Estos agentes de unión secundarios pueden comprender anticuerpos, haptenos u otros equivalentes de unión (por ejemplo, avidina) que se unen a los marcajes indirectos. Los agentes de unión secundarios están marcados preferiblemente con restos fluorescentes, restos radiactivos, enzimas, etc.

En otra realización preferida, el producto de la amplificación puede detectarse y cuantificarse durante la reacción de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real, cuyas variaciones son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, el sistema TaqMan usa un cebador sonda que hibrida con secuencias en una secuencia interna en el segmento de ácido nucleico englobado por los cebadores usados para amplificar el ácido nucleico diana (Heid, C.A. et al., *Genome Res.* 6: 986-994 (1996); Holland, P.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280 (1991)). Esta sonda se marca con dos marcajes fluorescentes diferentes (es decir, sonda oligonucleotídica fluorogénica doblemente marcada), el marcaje informador 5' terminal (TAMRA) y el marcaje apantallador de la fluorescencia 3' terminal (FAM). La escisión de la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa durante la fase de extensión de la PCR libera la molécula fluorogénica de la proximidad del apantallador, lo que resulta así en una intensidad incrementada de la fluorescencia.

En otro aspecto, la PCR cuantitativa en tiempo real puede basarse en la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) entre las sondas de hibridación (Wittwer, C.T. *Biotechniques* 22: 130-138 (1997)). En este método, dos sondas oligonucleotídicas hibridan con regiones adyacentes de la secuencia de ácido nucleico diana. La sonda en 5' se marca en el extremo 3' con un marcaje excitador (por ejemplo, FITC) mientras que la sonda en 3' que hibrida adyacentemente se marca en el extremo 5' con un marcaje informador. La hibridación de las dos sondas a las secuencias de ácido nucleico diana amplificadas pone a los dos marcajes lo suficientemente cerca espacialmente como para ocurra FRET. Esto permite monitorizar la cantidad de producto amplificado durante la reacción en cadena de la polimerasa. Una estrategia similar se usa en las sondas de balizas moleculares (Tyagi, S. *Nat. Biotechnol.* 16: 49-53 (1998)). Las balizas moleculares son sondas oligonucleotídicas que comprenden un marcaje apantallador y un marcaje informador en extremos opuestos de un oligonucleótido específico producto de PCR. Los marcajes también pueden funcionar basados en FRET y, por lo tanto, también pueden comprender un marcaje de excitación y un marcaje informador. Los segmentos complementarios cortos en las regiones 5' y 3' terminales permiten la formación de una estructura en tallo-bucle, que pone a los marcajes en los extremos terminales del oligonucleótido muy cerca entre sí, resultando así en el apantallamiento de la fluorescencia o FRET. Cuando el oligonucleótido hibrida con un producto de PCR mediante secuencias complementarias en la región interna de la sonda baliza molecular, la fluorescencia de la sonda oligonucleotídica se ve afectada, permitiendo así la monitorización de la síntesis del producto.

La PCR cuantitativa en tiempo real también puede usar marcajes fluorescentes que se unen preferentemente a productos de amplificación que son ácidos nucleicos bicatenarios durante la reacción de PCR, proporcionando de esta manera una monitorización continua de la síntesis del producto (véase Higuchi, R. et al., *Biotechnology* 11: 1026-1030 (1993); Morrison, T.B. et al., *Biotechniques* 24: 954-962 (1998)). Los marcajes fluorescentes adecuados incluyen, entre otros, bromuro de etidio, YO PRO-1™ (Ishiguro, T. *Anal. Biochem.* 229: 207-213 (1995)) y marcajes SYBR™ Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). Cuando se amplifican ácidos nucleicos diana que comprenden regiones repetitivas, no se prefieren FRET o sondas basadas en balizas moleculares si FRET o las sondas de balizas moleculares están dirigidas a unidades repetitivas porque hibridarán con secuencias repetitivas en los cebadores, no pudiendo de esta manera distinguir entre los cebadores y el producto amplificado.

En una realización preferida adicional, la PCR cuantitativa en tiempo real se consigue con cebadores que contienen un único fluoróforo unido cerca del nucleótido 3' terminal (Nazarenko, I. et al., *Nucleic Acids Res.* 30: e37 (2002); Nazarenko, I. et al., *Nucleic Acids Res.* 30: 2089-2195 (2002); Cebadores Fluorogénicos LUX™, Invitrogen, Palo Alto, CA). El extremo 5' de estos cebadores tiene una extensión de 5 a 7 nucleótidos capaz de hibridar con la región 3' terminal para generar una estructura en horquilla de extremos romos (es decir, tallo-bucle), cuya formación resulta en el apantallamiento de la fluorescencia del fluoróforo. Cuando el cebador forma un dúplex, por ejemplo por la extensión del cebador en un molde, el apantallamiento se reduce o elimina, proporcionando así una medida del producto de PCR en la muestra. Como se usa sólo un único fluoróforo, pueden usarse y detectarse diferentes fluoróforos en una única reacción. Consecuentemente, estos cebadores son útiles para la amplificación y detección de una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana en un único recipiente de reacción por el uso de diferentes conjuntos de cebadores con fluoróforos distinguibles. Como se discute en la presente memoria, varios ácidos nucleicos diana incluyen combinaciones de genes de copia única y secuencias repetitivas.

La instrumentación adecuada para la monitorización en tiempo real de las reacciones de PCR está disponible para uso en métodos de PCR cuantitativa (ABI Prism 7700, Applied Biosystems Division, Perkin Elmer, Forsters City, EEUU; LightCycler™, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, EEUU).

5 Cuando se usa PCR cuantitativa en tiempo real para detectar y medir los productos de la amplificación, se usan varios algoritmos para calcular el número de ácidos nucleicos diana en las muestras (véase el programa informático ABI Prism 7700 Versión 1.7; programa informático LightCycler™ Versión 3, incorporados por referencia). La cuantificación puede implicar el uso de muestras estándar con un número conocido de copias del ácido nucleico diana y la generación de curvas estándar a partir de los algoritmos de los estándares y el ciclo de umbral (C_t). En general, C_t es el ciclo de PCR o ciclo fraccionado de PCR en el que la fluorescencia generada por el producto de la amplificación está varias desviaciones por encima de la fluorescencia de la línea base (Higuchi, R. et al., *supra*). La PCR cuantitativa en tiempo real proporciona una linealidad de aproximadamente 7 u 8 órdenes de magnitud, lo que permite la medida del número de copias de los ácidos nucleicos diana sobre un intervalo dinámico amplio. El número absoluto de copias del ácido nucleico diana puede obtenerse comparando los valores C_t de una curva estándar y de las muestras.

10 El número de copias de los ácidos nucleicos diana también puede determinarse por PCR cuantitativa en tiempo real comparativa. El uso de ácidos nucleicos con un número de copias conocido o número de copias consistente permite la cuantificación del número de copias de ácidos nucleicos diana en una muestra. El estándar puede ser un gen con copia única, un ácido nucleico con número de copias conocido o, cuando se cuantifica el número de copias de ARN, un gen interno expresado constitutivamente (véase Johnson, M.R. *Anal. Biochem.* 278: 175-184 (2000); Boulay, J.-L. et al., *Biotechniques* 27: 228-232 (1999)).

15 Las composiciones y métodos descritos anteriormente encuentran uso en cualquier proceso para amplificar ácidos nucleicos diana por la reacción en cadena de la polimerasa. Así, la presente invención es útil para detectar y monitorizar enfermedades infecciosas, por ejemplo, para ensayar la presencia de bacterias y virus patógenos (por ejemplo, carga viral). Por ejemplo, los ácidos nucleicos virales diana incluyen, sin limitación, VIH, citomegalovirus HCV, hepatitis, etc. La presente invención también es aplicable en la monitorización de terapias médicas. Por ejemplo, esto puede implicar la monitorización del progreso de infecciones bacterianas después de la administración de antibiótico.

20 La presente invención encuentra aplicaciones en la caracterización del estado funcional de las células, especialmente para cambios celulares asociados con estados patológicos. Por ejemplo, la amplificación de segmentos genéticos particulares durante la progresión del cáncer en cáncer de ovario o de mama está correlacionada no sólo con el estadio del cáncer sino también con las proporciones de supervivencia (véase Kalioniemi, A et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2156-2160 (1994)). Así, la cuantificación de la amplificación génica tiene un valor de diagnóstico y pronóstico para una variedad de tumores (Kawate, S. et al., *Oncology* 57: 157-163 (1999); Biechi, I. et al., *Int. J. Cancer* 78: 661-666 (1998)). Por el contrario, la pérdida de elementos genéticos (es decir, la pérdida de heterocigosidad o inestabilidad de microsatélites) también está asociada con estados patológicos particulares, proporcionando así un foco de atención útil para el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, las deleciones en la región cromosómica 18q21 se observan frecuentemente en cánceres colorrectales mientras que el gen supresor de tumores p53 localizado en el cromosoma 17p13.1 está delecionado frecuentemente en una variedad de tipos de cáncer (Largey, J.S. et al., *Cancer* 17: 1933-1937 (1993)).

25 En la función celular y las enfermedades son particularmente importantes las secuencias repetitivas, especialmente las secuencias repetitivas en tándem encontradas en los genomas de muchos organismos. En los eucariotas, estas secuencias se clasifican generalmente en tres categorías principales: satélite, minisatélite y microsatélite. Los ADN satélites tienen longitudes repetidas de aproximadamente 1 a varios miles de bases y pueden constituir regiones repetitivas de hasta 100 millones de agrupaciones de pares de bases, por ejemplo en regiones heterocromáticas de los cromosomas eucariotas. Estas secuencias están asociadas principalmente con centrómeros y telómeros. Las secuencias minisatélite son moderadamente repetitivas, matrices repetidas en tándem de aproximadamente 9-100 repeticiones de pares de bases, que tienen generalmente longitudes medias de matriz de aproximadamente 0,5 a 30 kb. Éstas se encuentran generalmente en regiones eucromáticas y tienen un tamaño altamente variable. Los microsatélites son matrices moderadamente repetitivas de repeticiones cortas (es decir, aproximadamente 2-6 pares de bases). Los números de copias de estas repeticiones varían en una población, teniendo típicamente tamaños medios de secuencia de aproximadamente 10 a 100 bases. En muchos casos, los cambios en la magnitud de las repeticiones se correlacionan frecuentemente con determinadas enfermedades. Por ejemplo, el incremento en el número de copias de repeticiones de triplete CGG, CTG y GAA está asociado con la enfermedad de Huntington, síndrome de X frágil y distrofia miotónica. La magnitud de la expansión de estas repeticiones en triplete está asociado frecuentemente con la gravedad o aparición del estado patológico de manera que la progenie que hereda las repeticiones expandidas tiene trastornos más graves o, cuando el trastorno no es congénito, una edad más temprana de aparición. Los trastornos relacionados con la expansión de secuencias repetidas en tándem no están limitados a repeticiones de trinucleótidos y pueden implicar unidades de repetición mayores (véase Lafreniere, R.G. et al., *Nat. Genet.* 15: 298-302 (1997)).

30 Las secuencias repetitivas en tándem también tienen funciones biológicas importantes. Con algunas excepciones (por ejemplo, levadura de gemación), los centrómeros de la mayor parte de las plantas, animales y hongos tienen matrices grandes de secuencias repetitivas en tándem. Aunque los papeles fisiológicos de estas secuencias no son seguros, se cree que funcionan en el ensamblaje del cinetocoro para asegurar una segregación cromosómica fiel y eficaz. Así, la

determinación de la variabilidad en el número de repeticiones puede proporcionar información acerca de la función y regulación de los centrómeros y enfermedades relacionadas con la disfunción de los centrómeros.

5 Tienen una importancia más definida en la función celular las secuencias repetidas en tándem que comprenden los telómeros de cromosomas eucariotas lineales. El ADN telomérico o región telomérica es la región cromosómica localizada en los extremos de los cromosomas, que consisten en matrices en tándem de unidades repetitivas de secuencias cortas que varían de aproximadamente 5 a 26 pares de bases. Las regiones teloméricas de diferentes organismos se diferencian en su unidad repetitiva o secuencia repetida. Estas secuencias repetidas se conocen para una variedad de organismos, incluyendo el ser humano y otros mamíferos, *Tetrahymena*, levadura, *Drosophila* y nematodos. En los seres humanos, la unidad telomérica repetitiva es 5'-TTAGGG-3' mientras que la unidad repetitiva en *Tetrahymena* es 5'-TTGGGG-3'.

10 La unidad telomérica repetitiva no sólo varía entre especies respecto a la secuencia repetida, sino también respecto al número de unidades repetitivas en un organismo. Está bien establecido que la longitud e integridad de los telómeros es importante para el crecimiento celular y la segregación correcta de los cromosomas. Por ejemplo, el desarrollo de muchos tipos de cánceres se correlaciona con la activación del mantenimiento del telómero mientras que la senescencia celular, una afección en la que las células han perdido su capacidad de replicarse, aunque están presentes las señales replicativas normales, se correlaciona con pérdida de la integridad del telómero. Por ejemplo, el acortamiento del telómero induce senescencia proliferativa en las células mientras que la inhibición de la telomerasa puede dar lugar a apoptosis celular inducida (Zhang, X. et al., *Genes Dev.* 2388-2399 (1999)). Además, la inactivación génica del ARN de la telomerasa en ratones resulta en animales con defectos en el desarrollo, patologías relacionadas con la edad y susceptibilidad incrementada al cáncer (Rudolph, K.L. et al., *Cell* 96: 701-712 (1999); Herrera, E. et al., *EMBO J.* 18: 2950-2960 (1999)).

15 Así, la medición del número de unidades repetitivas de secuencias repetitivas específicas encuentra importantes aplicaciones, incluyendo, pero no limitadas a, diagnóstico del cáncer, diagnóstico de enfermedades relacionadas con la edad, integridad de organismos clonados, cribado de trastornos hereditarios y cribado de fármacos para agentes dirigidos a enzimas (es decir, telomerasa) y rutas celulares que regulan la longitud de las secuencias repetitivas.

20 Así, en una realización preferida, la presente invención proporciona un análisis rápido de las longitudes del telómero por amplificación directa de las secuencias repetidas usando cebadores incapaces de generar dímeros de cebador pero capaces de extensión del cebador cuando hibridan con las unidades teloméricas repetitivas. Como los telómeros de varios organismos tienen diferentes secuencias de unidad repetitiva, la amplificación de los telómeros de un organismo específico empleará cebadores específicos para la unidad repetitiva del organismo. Las secuencias teloméricas humanas se usan en la presente memoria para ilustrar la práctica de la presente invención para la amplificación directa y cuantificación de secuencias de ácido nucleico repetidas en tándem, pero no está limitada a la realización específica descrita en la presente memoria.

25 En la determinación del número de unidades teloméricas repetitivas, los cebadores seleccionados son complementarios a unidades repetitivas en la región repetitiva. El primer cebador tiene secuencias complementarias a las secuencias teloméricas repetitivas en una primera cadena única del ácido nucleico diana, y un segundo cebador tiene secuencias complementarias a las secuencias teloméricas repetitivas en una segunda cadena única del ácido nucleico diana, en el que la primera y segunda cadenas son sustancialmente complementarias. En una realización preferida, los residuos de nucleótido del primer cebador están alterados para producir emparejamientos erróneos entre los residuos alterados y los residuos de nucleótidos en la posición de nucleótido idéntica de cada unidad telomérica repetitiva de la primera cadena del ácido nucleico diana. Estos residuos alterados también producen un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal del segundo cebador cuando los cebadores hibridan entre sí. En otra realización preferida, los residuos de nucleótidos del segundo cebador también están alterados de manera similar de manera que la hibridación de los cebadores entre sí resulta en el primer y segundo cebador con nucleótidos 3' terminales emparejados erróneamente.

30 En la realización preferida, los residuos de nucleótidos alterados que producen los emparejamientos erróneos están tanto en el primer como segundo cebador para limitar la formación de cualquier producto dímero de cebador. En esta disposición, los emparejamientos erróneos pueden estar en posiciones de nucleótidos adyacentes o no adyacentes de la unidad repetitiva. Los emparejamientos erróneos en posiciones de nucleótidos adyacentes de la unidad repetitiva maximizan el número de residuos emparejados por pares de bases del nucleótido 3' terminal al residuo alterado de cada cebador. Una ejemplificación de cebadores para amplificación de unidades teloméricas repetitivas humanas se proporciona en la Figura 1.

35 Posteriormente al contacto del primer y segundo cebadores con la forma monocatenaria de la región repetitiva, los cebadores se extienden por la polimerasa y las unidades repetitivas se amplifican por ciclos reiterativos de desnaturalización, hibridación y extensión. En una realización preferida, la región 5' terminal comprende secuencias no

emparejadas por pares de bases para restringir el cebado de repeticiones internas de las secuencias repetitivas amplificadas.

5 Los productos amplificados se cuantifican como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, se usa PCR cuantitativa en tiempo real para determinar el número de copias de la unidades teloméricas repetitivas en la muestra del ácido nucleico diana. Los estándares para determinar y comparar el número de unidad telomérica repetitiva incluyen el uso de genes de copia única (por ejemplo, fosfoproteína ribosómica, *364B*) o un ácido nucleico diana con un número de copias conocido (por ejemplo, un plásmido con un número conocido de unidades teloméricas repetitivas). Con los métodos descritos en la presente memoria, puede cuantificarse el número de copias de unidades repetitivas de un gran número de muestras para los propósitos de determinar el número de unidades teloméricas repetitivas y así la longitud media de los telómeros.

10 La medición del número de unidades repetitivas de los telómeros tiene una amplia variedad de aplicaciones en el diagnóstico médico, pronóstico de enfermedades y terapéutica. La presente invención es útil para determinar las longitudes de telómeros de varios tipos de células cancerosas ya que la activación de la actividad telomerasa está asociada con la inmortalización de las células. Las células pueden analizarse durante el tiempo para determinar si un incremento, disminución o estabilización de los telómeros está asociada con la progresión de la enfermedad. Varios tipos de células cancerosas que se pueden ensayar incluyen cáncer de mama, hígado, cerebro, hueso, próstata, linfocitos, melanoma, colon, etc.

15 La presente invención también encuentra uso en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con un inicio temprano del envejecimiento. Por ejemplo, los individuos con enfermedad progeria Hutchinson Gilford muestran un envejecimiento prematuro y reducción en el potencial proliferativo de los fibroblastos asociado con pérdida de longitud de los telómeros (Allsopp, R.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10114-10118 (1992)) mientras que los pacientes con disqueratosis congénita presentan un fallo de la médula ósea progresivo, pigmentación anormal de la piel, leucoplaquia y distrofia de las uñas debido a una delección del ARN de la telomerasa (véase Vulliamy, T. Nature 413: 432-435 (2001)). Así, la amplificación y cuantificación del número de repeticiones teloméricas es útil para determinar la asociación de enfermedades particulares con cambios en la longitud de los telómeros.

20 En otra realización preferida, la presente invención es útil para monitorizar la eficacia de terapéuticos o en el cribado de candidatos a fármaco que afectan la longitud del telómero o la actividad telomerasa. Por ejemplo, la presente invención encuentra uso en la monitorización de la eficacia de la terapia del cáncer ya que el potencial proliferativo de las células puede estar relacionado con el mantenimiento de la integridad del telómero. La capacidad de monitorizar las características del telómero puede proporcionar una ventana para examinar la eficacia de terapias y agentes farmacológicos particulares. En otro aspecto, la presente invención encuentra uso como un método general de cribado de fármacos candidatos que afectan las rutas biológicas que regulan la longitud del telómero, tal como la actividad telomerasa. La capacidad de amplificar rápidamente repeticiones teloméricas proporciona un método de cribado de alto rendimiento para identificar moléculas pequeñas, ácidos nucleicos candidatos y agentes peptídicos que afectan las características teloméricas en la célula.

25 El experto en la técnica entiende que las etapas para construir los cebadores y los métodos para amplificar secuencias de ácido nucleico diana pueden variarse según las opciones proporcionadas en la presente memoria. Los ejemplos siguientes sirven para describir más completamente la manera de usar y el mejor modo para la invención descrita anteriormente.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Amplificación directa de secuencias teloméricas repetitivas humanas

45 El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre por procedimientos estándar. Las muestras usadas para comparar las estrategias de PCR cuantitativa frente a transferencia Southern respecto a la medida del telómero fueron proporcionadas por 21 individuos no relacionados (11 mujeres y 10 hombres, intervalo de edad 61-94 años) de familias de Utah que son parte de la colección del Centro para los Estudios del Polimorfismo Humano (CEPH) usada en todo el mundo para construir el mapa de ligamiento genético humano (White, R. et al., Nature 313: 101-105 (1985)). Las muestras de ADN purificado se diluyeron en placas fuente de microtitulación de 96 pocillos a aproximadamente 1,75 ng/ul en 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5 (volumen final 300 ul por pocillo), se calentaron hasta 95°C durante 5 minutos en un ciclador térmico, se enfriaron rápidamente por transferencia a un baño de hielo-agua durante 5 minutos, se centrifugaron brevemente a 700 x g, se sellaron con papel de aluminio adhesivo y se almacenaron a 4°C hasta el momento del ensayo.

ES 2 379 375 T3

Se realizaron PCR cuantitativas en tiempo real de las muestras de ADN extraídas en placas de 96 pocillos separadas. Se prepararon dos mezclas maestras de reactivos de PCR, una con el par de cebadores del telómero (T), la otra con el par de cebadores del gen de copia única (S). Dependiendo de las condiciones de la reacción, se añadieron 30 ó 10 µl de la mezcla maestra T a cada pocillo de muestra y pocillo de curva estándar en la primera placa y se añadieron 30 ó 10 µl de la mezcla maestra S a cada pocillo de muestra y pocillo de curva estándar en la segunda placa. Para cada individuo en el que se ensayó la proporción T/S, se añadieron tres alícuotas idénticas de 20 µl de la muestra de ADN (35 ng por alícuota) a la placa 1 y se añadieron otras tres alícuotas en las mismas posiciones de pocillos en la placa 2. Para cada curva estándar, una muestra de ADN estándar se diluyó seriadamente en TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0) ~1,68 veces por dilución para producir cinco concentraciones de ADN que varían de 0,63 ng/µl hasta 5 ng/µl, que se distribuyeron en alícuotas de 20 µl en los pocillos de curva estándar de cada placa. Las placas se sellaron con una cubierta adhesiva transparente, se centrifugaron brevemente a 700 x g y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta que se realizó la PCR (0-3 días después).

Las condiciones de amplificación por PCR dependieron de los cebadores usados y del ADN molde que se amplificaba. En un conjunto de experimentos, las secuencias repetidas del telómero se amplificaron con el conjunto de cebadores tel 1 (5'-GGTTTTTGGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3') (SEQ ID NO: 1) y tel 2 (5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3') (SEQ ID NO: 2). Las concentraciones de los reactivos en las mezclas de PCR fueron 150 nM 6-ROX y 0,2x SYBR™ Green I (Molecular Probes, Inc.); 15 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 5 mM DTT; 1% DMSO; 1,25 unidades de ADN Polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc.); 270 nM del cebador tel 1; y 900 nM del cebador tel 2 en un volumen final de 50 µl. El perfil de ciclo térmico empezó con una incubación a 95°C durante 10 min, para activar la ADN Polimerasa AmpliTaq Gold seguido de 18 ciclos de 95°C x 15 s y 54°C x 2 min.

Alternativamente, las secuencias de cebador específicas de telómero se optimizaron para tener T_ms similares, particularmente diseñando los cebadores para que tengan un contenido GC similar o idéntico. Cada cebador del conjunto de cebadores tel 1b; (5'-CGGTTTTGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTT-3') (SEQ ID NO: 8) y tel 2b; (5'-GGCTTGCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCT-3') (SEQ ID NO: 9) porta una sustitución de una única base introducida a propósito en la sexta base desde el extremo 3' y en cada sexta base posterior en la dirección 5', para un total de cinco cambios de bases introducidos en cada sexta posición de la secuencia repetida. Cuando los cebadores hibridan con el ADN telomérico diana, resultan cinco emparejamientos erróneos de base única pero los híbridos tienen complementariedad perfecta con las secuencias de ADN teloméricas diana en las últimas cinco bases en el extremo 3' de cada cebador. La hibridación de los cebadores entre sí resulta en el emparejamiento de pares de bases en cuatro de seis posiciones y el residuo 3' terminal de cada cebador forma un emparejamiento erróneo con el otro cebador. Las condiciones de PCR con estos cebadores con T_m optimizada fueron 0,4 x Sybr Green I, 15 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1% DMSO; 2,5 mM DTT; 200 µM de cada dNTP; 0,75 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold, 450 nM de cebador tel 1b y 450 nM de cebador tel 2b, en un volumen final de 30 µl por reacción. El perfil del ciclo térmico fue 95°C x 10 min, seguido de 18 ciclos de 95°C durante 15 seg, (desnaturalización) y 56°C durante 2 min. (hibridación/extensión). No se necesita marcaje ROX para esta condición de ensayo. En general, se hicieron tres reacciones de PCR de telómero en cada ADN experimental. Cada placa de PCR de telómero de 96 pocillos contenía una fila con pocillos 2 NTC (sin ADN genómico) y 10 pocillos de curva estándar que contenían una dilución seriada de un ADN de referencia para cinco concentraciones, con cada concentración en duplicado, que varía de 0,25 ng/microlitro (concentración final) hasta 2 ng/microlitro (concentración final).

El gen *36B4*, que codifica la fosfoproteína ribosomal ácida PO, se usó para normalizar la señal de telómero (Boulay et al., *Biotechniques* 27: 228-232 (1999)). El conjunto de cebadores usado fue 36B4u (5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3') y 36B4d (5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'). Las condiciones de PCR contenían 150 nM 6-ROX y 0,2xSYBR™ Green I (Molecular Probes, Inc.); 15 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 5 mM DTT; 1% DMSO; 1,25 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc.); 300 nM de cebador 36B4u; y 500 nM de cebador 36B4d en un volumen final de 50 µl por reacción. El perfil del ciclo térmico fue incubación a 95°C durante 10 min, seguido de 30 ciclos de 95°C x 15 seg, 58°C x 1 min. Alternativamente, para amplificaciones óptimas, las reacciones de PCR contenían 0,4xSybr Green I, 15 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1% DMSO; 2,5 mM DTT; 200 µM de cada dNTP; 0,75 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold, 300 nM de cebador 36B4u y 500 nM de cebador 36B4d en un volumen final de 30 µl por reacción. El perfil del ciclo térmico fue 95°C x 10 min, seguido de 30 ciclos de 95°C x 15 seg, (desnaturalización) y 56°C durante 1 min. (hibridación/extensión). No se necesitó marcaje ROX bajo el segundo conjunto de condiciones.

De manera similar a la amplificación de las repeticiones teloméricas, se hicieron tres reacciones de PCR *36B4* en cada muestra de ADN experimental. Cada placa de PCR de telómero de 96 pocillos contenía una fila con pocillos 2 NTC (sin ADN genómico) y 10 pocillos de curva estándar que contenían una dilución seriada de un ADN de referencia para cinco concentraciones, con cada concentración en duplicado, que varía de 0,25 ng/microlitro (concentración final) hasta 2 ng/microlitro (concentración final).

Todas las PCR se realizaron en el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EEUU), un ciclador térmico equipado para excitar y leer emisiones de moléculas fluorescentes durante cada ciclo de la PCR. Se usó el programa informático ABI SDS versión 1.7 para generar la curva estándar para cada placa y para determinar los factores de dilución de los estándares correspondientes a las cantidades de T y S en cada muestra.

5 En presencia de 35 ng de ADN humano, un producto telomérico de PCR fue detectable por PCR cuantitativa en tiempo real empezando desde aproximadamente 9 ciclos de PCR. El análisis del producto después de 25 ciclos por electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio muestra una mancha de productos empezando desde aproximadamente 76 pares de bases, lo que es equivalente a la suma de las longitudes de los cebadores específicos de telómero (véase la Figura 1), hasta productos de aproximadamente 400 pares de bases (Figura 4). El número de copias de la PCR es proporcional al número de sitios disponibles para unión del cebador en el primer ciclo de la PCR. La omisión del ADN genómico resulta en un producto de amplificación no detectable después de 25 ciclos tanto para los cebadores teloméricos como de gen de copia única.

Ejemplo 2

Determinación de la longitud telomérica relativa

15 Se determinaron las longitudes medias del fragmento de restricción telomérico (TRF) según describen Slagboom et al., Am. J. Hum. Genet. 55: 876-882 (1994), incorporado en la presente memoria por referencia. Aproximadamente 0,5 ug de ADN purificado de sangre completa se digirieron completamente con la enzima de restricción Hae III. Las muestras digeridas se mezclaron con estándares de tamaño de ADN, se separaron por electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon. Las membranas se hibridaron con oligonucleótido marcado en el extremo con ³²P, (TTAGGG)₇, se lavaron para eliminar la sonda unida no específicamente, se expusieron a una placa de fósforo durante 1 a 5 días y las placas se escanearon con un Fosforimager (Molecular Dynamics, Inc.). Se quitó de las transferencias la sonda telomérica, se hibridaron con sonda marcada radiactivamente para los estándares de tamaño de ADN, se lavaron, se expusieron a una placa de fósforo y las placas se escanearon. Las imágenes de los estándares de tamaño y la imágenes de las manchas teloméricas se superpusieron para localizar las posiciones de los intervalos de tamaño en las manchas teloméricas. Se calculó la longitud media de TRF como longitud media de TRF = $(\sum OD_i)/(\sum OD_i/L_i)$, en la que OD_i es la radiactividad total por encima del fondo en el intervalo i y L_i es la longitud media de i en pares de bases. Este procedimiento completo se realizó dos veces: es decir, los dos valores de longitud media de TRF determinados en cada individuo se obtuvieron de dos experimentos independientes.

30 Para medir el valor T/S (proporción telómero a gen de copia única), el valor C_t - el número fraccionado de ciclos al que la fluorescencia que acumula la muestra en la amplificación para un valor umbral fijado que es varias desviaciones estándar por encima de la fluorescencia de fondo - se determinó para las muestras amplificadas con cebadores específicos de telómero (T) y cebadores específicos de gen de copia única (S). Como la cantidad del producto de PCR es aproximadamente el doble en cada ciclo de la PCR, la proporción T/S es aproximadamente $[2^{C_t(\text{telómeros})}/2^{C_t(\text{gen de copia única})}]^{-1} = 2^{-\Delta C_t}$. El ΔC_t medio fue -9,05 (véase la Figura 2). Esto es, la PCR de un gen de copia única requirió aproximadamente 9 ciclos más que la PCR de los telómeros para producir una señal fluorescente equivalente según se mide por PCR en tiempo real. La desviación estándar fue 1,48%.

40 La proporción relativa T/S, que es la T/S de una muestra respecto a la T/S de otra muestra, se expresa como $2^{-(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$. Esta fórmula permite el cálculo de la proporción relativa T/S en cada muestra. Las muestras de ADN de 21 pacientes no relacionados se amplificaron y cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real (véase el Experimento 2). La comparación de la proporción relativa T/S calculada de la PCR se correlacionó bien con las longitudes medias de TRF determinadas por hibridación Southern (véase la Figura 3). La intersección con el eje y es aproximadamente 3,6 kpb, que es aproximadamente la longitud media de la región subteloamérica entre los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción y el comienzo de las repeticiones hexaméricas teloméricas (Hultdin, M. Nucleic Acids Res. 26: 3651-3656 (1998)). Además, la longitud telomérica media observada en la sangre completa según se mide por la proporción relativa T/S varía en un intervalo de 2,5 entre adultos no relacionados de edad y sexo equivalentes. Este intervalo de variabilidad está totalmente de acuerdo con otros estudios en el intervalo de la variación de las longitudes de TRF en adultos de edad equivalente si la longitud subteloamérica media de 3,4 kpb se resta de cada longitud media de TRF indicada (Hultdin, M. Nucleic Acids Res. 26: 3651-3656 (1998); Vaziri, H. et al., Am. J. Hum. Genet. 52: 661-667 (1993)).

50

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Utah
- <120> Reducción de las Amplificaciones No Dependientes de Ácido Nucleico Diana: Amplificación de Secuencias Repetitivas de Ácido Nucleico
- 5 <130> AHB/FP6238687
- <140>EP 03707624.7
- <141> 2003-01-31
- <150> PCT/US03/02844
- <151> 2003-01-31
- 10 <150> US 60/353.591
- <151> 2002-01-31
- <160> 10
- <170> Patentín versión 3.2
- <210> 1
- 15 <211> 37
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador sintético
- 20 <400> 1
- ggttttttag ggtgagggtg agcctgaggg tgagggt 37
- <210> 2
- <211> 39
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador sintético
- <400> 2
- ttccgactat cctctaccct atccctatcc ctatcccta 39 |
- 30 <210> 3
- <211> 90
- <212> ADN
- <213> Humano
- <400> 3

ES 2 379 375 T3

ccctaaccct aaccctaacc ctaaccctaa ccctaaccct aaccctaacc ctaaccctaa 60
ccctaaccct aaccctaacc ctaaccctaa 90
<210> 4
<211> 90
<212> ADN
5 <213> Humano
<400> 4
ttagggttag ggtagggtt agggtaggg ttagggtag ggtagggtt agggtaggg 60
ttagggttag ggtagggtt agggtaggg 90
<210> 5
<211> 120
10 <212> ADN
<213> Humano
<400> 5
ttagggttag ggtagggtt agggtaggg ttagggtag ggtagggtt agggtaggg 60
ttagggttag ggtagggtt agggtaggg ttagggtag ggtagggtt agggtaggg 120
<210> 6
15 <211> 23
<212> ADN
<213> Humano
<400> 6
cagcaagtg gaaggtgaa tcc 23
20 <210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Humano
<400> 7
25 ccattctat caicaaggg taca 25
<210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 8

cggtttgttt gggttgggt ttgggttgg gtttgggt 39

<210> 9

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 9

10 ggcttgcdt accctacc cttaccctac ccttaccct 39 |

<210> 10

<211> 42

<212> ADN

<213> Humano

15 <400> 10

ttaggttag ggttaggtt aggttaggg ttaggttag gg 42 |

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana humano que comprende:
- 5 a) poner en contacto un ácido nucleico diana que comprende primera y segunda cadenas sustancialmente complementarias con un primer y segundo cebador, en el que dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dichos cebadores hibridados son capaces de la extensión de cebador cuando hibridan con sus cadenas respectivas, y en el que al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un emparejamiento erróneo de pares de bases entre dicho primer cebador y un nucleótido en dicha unidad repetitiva cuando dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena, en el que dicho primer cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí, en el que al menos un nucleótido en dicho segundo cebador produce un emparejamiento erróneo de pares de bases entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dicho segundo cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho primer cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí; y
- 10 b) amplificar el ácido nucleico diana por la reacción en cadena de la polimerasa.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer y segundo cebadores comprenden además secuencias 5' terminales que no hibridan con dichas unidades repetitivas.
- 20 3. Método según la reivindicación 1, en el que dichos emparejamientos erróneos están en posiciones de nucleótidos adyacentes de dicha unidad repetitiva.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dichos emparejamientos erróneos están en posiciones de nucleótidos no adyacentes de dicha unidad repetitiva.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha unidad repetitiva comprende repeticiones de hexanucleótidos.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha unidad repetitiva comprende repeticiones de pentanucleótidos.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha unidad repetitiva comprende repeticiones de tetranucleótidos.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicha unidad repetitiva comprende unidades teloméricas repetitivas.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho primer cebador comprende la SEQ ID NO: 1 y dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 2.
- 30 10. Método según la reivindicación 8, en el que dicho primer cebador comprende la SEQ ID NO: 8 y dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 9.
11. Método para determinar el número de unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana según la reivindicación 1 que comprende además medir la cantidad de producto amplificado (T).
12. Método según la reivindicación 11 en el que dicha medición es por PCR cuantitativa en tiempo real.
- 35 13. Método según la reivindicación 11, que comprende además
- a) amplificar un ácido nucleico diana con un número de copias conocido (S); y
- b) determinar la proporción T/S para determinar el número de copias de la unidad repetitiva.
14. Método según la reivindicación 13 para diagnosticar cáncer.
15. Método según la reivindicación 13 para diagnosticar senescencia celular.
- 40 16. Uso de una composición para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana humano que comprende primera y segunda cadenas diana sustancialmente complementarias, comprendiendo dicha composición un primer y segundo cebador, en el que dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dichos cebadores hibridados son capaces de la extensión de cebador cuando hibridan con sus cadenas respectivas, y en el que al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un emparejamiento erróneo de pares
- 45

5 de bases entre dicho primer cebador y un nucleótido en dicha unidad repetitiva cuando dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena, en el que dicho primer cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí, en el que al menos un nucleótido de dicho segundo cebador produce un emparejamiento erróneo de pares de bases entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dicho segundo cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho primer cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí.

10 17. Composición para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva de un ácido nucleico diana humano que comprende primera y segunda cadenas diana sustancialmente complementarias, comprendiendo dicha composición un primer y segundo cebador, en el que dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena y dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dichos cebadores hibridados son capaces de la extensión de cebador cuando hibridan con sus cadenas respectivas, y en el que al menos un nucleótido de dicho primer cebador produce un emparejamiento erróneo de pares de bases entre dicho primer cebador y un nucleótido en dicha unidad repetitiva cuando dicho primer cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha primera cadena, en el que dicho primer cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí, en el que al menos un nucleótido de dicho segundo cebador produce un emparejamiento erróneo de pares de bases entre dicho segundo cebador y un nucleótido de dicha unidad repetitiva cuando dicho segundo cebador hibrida con al menos una unidad repetitiva de dicha segunda cadena, en el que dicho segundo cebador también produce un emparejamiento erróneo con el nucleótido 3' terminal de dicho primer cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí.

18. Uso según la reivindicación 16 o una composición según la reivindicación 17, en el que dicho primer y segundo cebadores comprenden además secuencias 5' terminales que no hibridan con dichas unidades repetitivas.

25 19. Uso o composición para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva según la reivindicación 18, en el que dichas unidades repetitivas comprenden unidades teloméricas repetitivas.

20. Uso o composición para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva según la reivindicación 19, en el que dicho primer cebador comprende la SEQ ID NO: 1 y dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 2.

21. Uso o composición para amplificar unidades repetitivas en una región repetitiva según la reivindicación 19, en el que dicho primer cebador comprende la SEQ ID NO: 8 y dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 9.

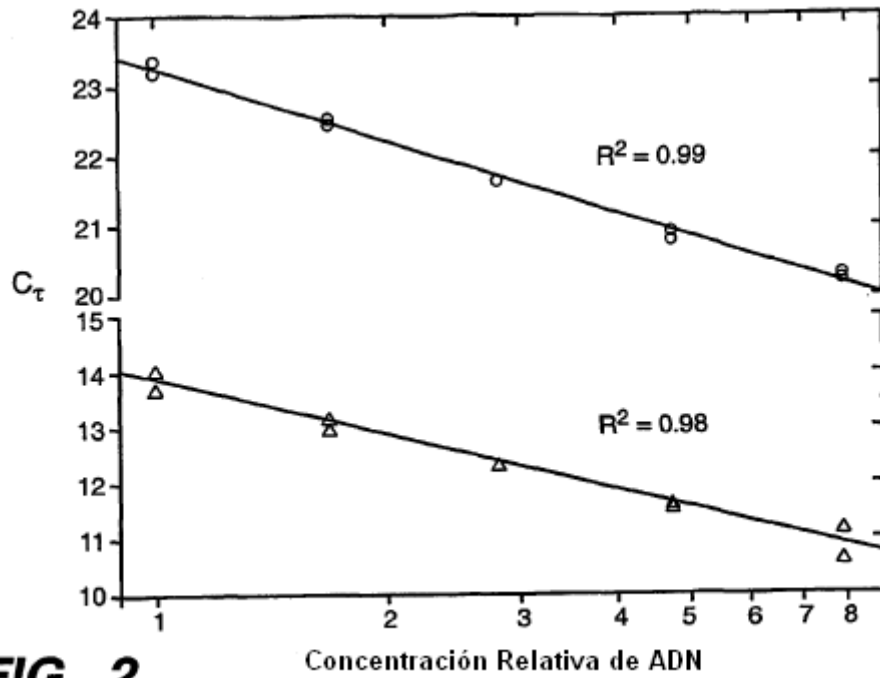


FIG._2

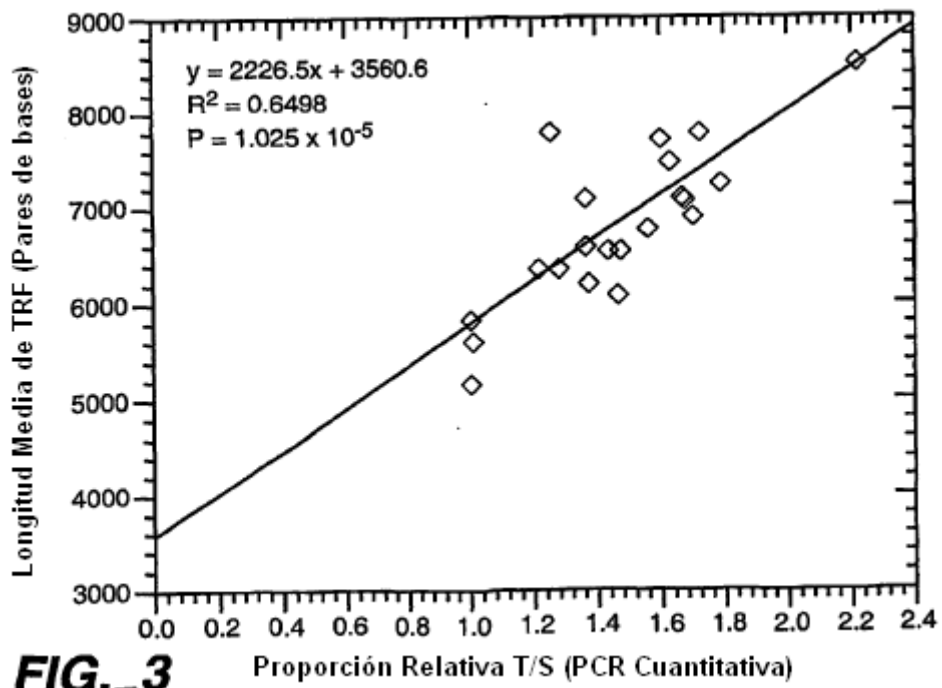


FIG._3

5

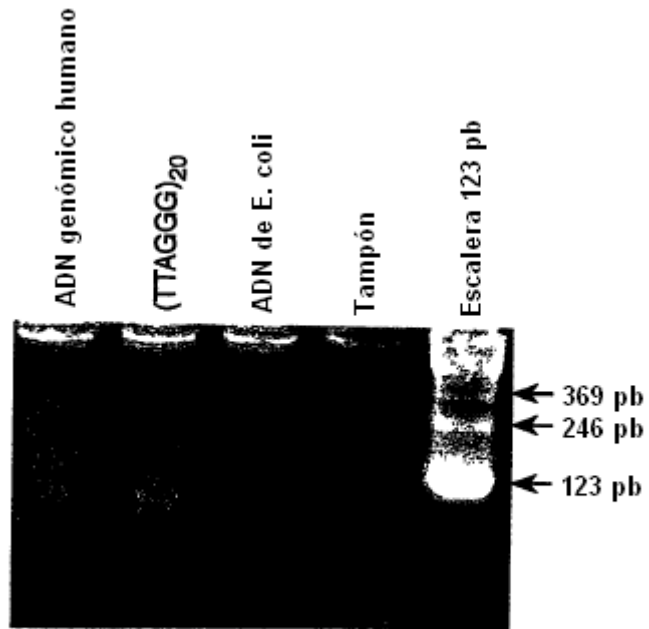


FIG._4