

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 681**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09777762 .7**
96 Fecha de presentación: **08.08.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2324124**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2011**

54 Título: **Extensión de cebadores correctora**

30 Prioridad:
12.08.2008 US 188841 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

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

72 Inventor/es:
**FISS, Ellen y
MYERS, Thomas William**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 384 681 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

Extensión de cebadores correctora

5 Antecedentes de la invención

10 El desarrollo de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ha revolucionado las ciencias del análisis e ingeniería genéticos. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza rutinariamente para amplificar ácidos nucleicos diana utilizando ácidos nucleicos cebadores seleccionados, por ejemplo para facilitar la detección del ácido nucleico diana como parte de un análisis diagnóstico, forense u otra aplicación. Los cebadores típicamente funcionan en parejas diseñadas para la extensión de un componente de la pareja hacia el otro cubriendo la región diana seleccionada. Un ciclo de PCR típico incluye una etapa de desnaturalización a temperatura elevada (por ejemplo 85°C o superior) durante la que las cadenas de ácidos nucleicos de doble cadena se separan uno de otro, una etapa de apareamiento a temperatura baja (por ejemplo entre 45°C y 65°C) durante la que los cebadores se hibridan con las cadenas individuales separadas, y una etapa de extensión a temperatura intermedia (por ejemplo aproximadamente 72°C) durante la que un ácido nucleico polimerasa extiende los cebadores. También se utilizan procedimientos de termociclado a dos temperaturas. Estos procedimientos generalmente incluyen una etapa de desnaturalización a alta temperatura y una etapa de apareamiento-extensión a baja temperatura.

20 También se describen PCRs en muchas patentes US diferentes, entre ellas, por ejemplo, la patente US nº 4.683.195, titulada "Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences", concedida a Mullis *et al.* el 28 de julio de 1987, la patente US nº 4.683.202, titulada "Process for amplifying nucleic acid sequences", concedida a Mullis el 28 de julio de 1987, y la patente US nº 4.965.188, titulada "Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme", concedida a Mullis *et al.* el 23 de octubre de 1990. Además, también se describen técnicas relacionadas con la PCR en diversas otras publicaciones, tales como Innis *et al.* (editores), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Elsevier Science & Technology Books, 1990, Innis *et al.* (editores), PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, 1999; Edwards *et al.*, Real-Time PCR, Taylor & Francis, Inc., 2004, y Rapley *et al.*, Molecular Analysis and Genome Discovery, John Wiley & Sons, Inc., 2004. La amplificación de ácidos nucleicos víricos utilizando cebadores degenerados que contienen inosina para la tolerancia a los desapareamientos se describe en Fujiwara *et al.*, Genome Research 4:239-240, 1995; U/Tma es la única polimerasa Exo⁺ utilizada con éxito con cebadores degenerados.

35 Además, se describen métodos de tipo PCR que utilizan cebadores quiméricos en los que se sustituyen el sexto y séptimo desoxirribonucleótidos del extremo 3' por ribonucleótidos (patente EP nº 1.167.524) o cebadores que contienen modificaciones 2'-O-metilo en combinación con una ADN polimerasa que no presenta actividad exonucleasa 3' a 5' (patente WO nº 2005/012499).

Breve descripción resumida de la invención

40 La presente invención proporciona métodos para llevar a cabo una reacción de extensión de cebadores. En algunas realizaciones, los métodos comprenden:

- a. poner en contacto un oligonucleótico con: (i) un ácido nucleico molde, e (ii) una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad exonucleasa 3' a 5', en la que:
- 45 i. el oligonucleótico comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad exonucleasa 3' a 5',
- ii. el nucleótido modificado no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótico,
- iii. el oligonucleótico presenta una parte 3' y una parte 5', en el que la parte 3' comprende los nucleótidos del oligonucleótico que se encuentran en el lado 3' del nucleótido modificado y la parte 5' comprende los nucleótidos del oligonucleótico que se encuentran en el lado 5' del nucleótido modificado, y
- 50 iv. la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para permitir que la polimerasa edite la parte 3' del oligonucleótico de una manera específica de molde en el caso de que la parte 3' del oligonucleótico no sea 100% complementaria al ácido nucleico molde, y
- 55 b. llevar a cabo una reacción de extensión de cebador mediante la extensión del oligonucleótico de un modo dependiente de molde, en la que el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato.

60 En algunas realizaciones, la parte 3' del oligonucleótico, antes de la edición, es entre 70% y 100% complementaria al ácido nucleico de molde.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de molde procede de una muestra biológica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de molde procede de un genoma vírico o bacteriano.

- En algunas realizaciones, el ácido nucleico de molde es ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de molde es ADN.
- 5 En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se encuentra 2 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se encuentra 5 a 7 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
- En algunas realizaciones, el oligonucleótido presenta:
- 10 entre 15 y 40 nucleótidos de longitud,
- es complementario por lo menos al 70% respecto al ácido nucleico de molde a lo largo de la longitud completa del oligonucleótido, y/o
- 15 el nucleótido modificado se encuentra 2 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
- En algunas realizaciones, la polimerasa comprende una modificación covalente térmicamente reversible, en la que la incubación a una temperatura superior a 50°C en un tampón acuoso a pH alcalino revierte la modificación covalente y resulta en un incremento de por lo menos dos veces de la actividad enzimática en menos de 20 minutos.
- 20 En algunas realizaciones, la etapa b comprende una reacción en cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, la etapa b comprende llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- En algunas realizaciones, el nucleótido modificado no comprende una fracción fluorescente.
- 25 La presente invención también proporciona mezclas de reacción que comprenden uno o más de los reactivos indicados en la presente memoria. Las mezclas de reacción comprenden un oligonucleótido, comprendiendo el oligonucleótido un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad exonucleasa 3' a 5' de un ácido nucleico polimerasa, en la que el nucleótido modificado no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, y el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato, pero no comprende una fracción fluorescente, y comprende un ácido nucleico polimerasa que presenta una actividad exonucleasa 3' a 5'.
- 30
- En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además un ácido nucleico molde. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además desoxinucleósidos trifosfato.
- 35 En algunas realizaciones, el oligonucleótido presenta una longitud de entre 15 y 40 nucleótidos.
- En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
- 40 La presente invención incluye además kits que comprenden uno o más reactivos indicados en la presente memoria. El kit comprende un oligonucleótido, comprendiendo el oligonucleótido un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad exonucleasa 3' a 5' de un ácido nucleico polimerasa, en el que el nucleótido modificado no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido y el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato, pero no comprende una fracción fluorescente y comprende un ácido nucleico polimerasa que presenta una actividad exonucleasa 3' a 5'.
- 45
- En algunas realizaciones, el kit comprende además desoxinucleósidos trifosfato.
- 50 En algunas realizaciones, el oligonucleótido presenta una longitud de entre 15 y 40 nucleótidos.
- En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
- 55 La presente solicitud también proporciona un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de un ácido nucleico polimerasa, en el que el nucleótido modificado no es el extremo 3'-terminal ó 5'-terminal ni en el penúltimo nucleótido desde el extremo 3' del oligonucleótido y el nucleótido modificado no comprende una fracción fluorescente.
- 60 En algunas realizaciones, el oligonucleótido presenta una longitud de entre 15 y 40 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

- 5 En algunas realizaciones, el nucleótido modificado comprende una fracción diferente de -H o -OH en la posición 2'.
En algunas realizaciones, el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, OH, O-fosfato y fosforotioato.

La presente invención también proporciona métodos para detectar la presencia, ausencia o cantidad de una entidad biológica en una muestra biológica. En algunas realizaciones, el método comprende:

- 10 a. poner en contacto un oligonucleótido con (i) una muestra biológica que se sospecha que presenta un ácido nucleico de la entidad biológica, e (ii) una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5', en el que el oligonucleótido comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' y que no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni en el penúltimo nucleótido desde el extremo 3' del oligonucleótido, y en el que dicho nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato y en el que el oligonucleótido es sustancialmente complementario al ácido nucleico de la entidad biológica,
15 b. llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, extendiendo de esta manera el oligonucleótido de una manera dependiente de molde para producir un producto polinucleótido complementario al ácido nucleico de la entidad biológica,
20 c. cuantificar el producto polinucleótido, o el complemento del mismo, y
d. correlacionar la cantidad de producto polinucleótido, o complemento del mismo, con la cantidad o presencia o ausencia de la entidad biológica en la muestra biológica.

- 25 En algunas realizaciones, la etapa de cuantificación comprende una PCR cuantitativa en tiempo real.

En algunas realizaciones, la entidad biológica es un virus, bacteria o célula cancerosa. En algunas realizaciones, el virus es un VIH, VHB o VHC.

- 30 En algunas realizaciones, la PCR comprende una etapa bajo condiciones que permiten la extensión del oligonucleótido existan o no cero, una, dos o tres desapareamientos entre el oligonucleótido y el ácido nucleico vírico, y en la que el oligonucleótido presenta uno o más desapareamientos con el ácido nucleico procedente de la entidad biológica y en la que la actividad de exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa edita el oligonucleótido, resultando en un producto polinucleótido que es totalmente complementario al producto polinucleótido.

- 35 En algunas realizaciones, la etapa de ejecución comprende además una o más polimerasas, algunas de las cuales no presenta sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5'.

En algunas realizaciones, la etapa de realización no incluye no incluye una polimerasa que no presente, o que sustancialmente no presente, actividad de exonucleasa 3' a 5'.

40 DEFINICIONES

Los términos "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 45 La expresión "ácido nucleico" se refiere a un polímero de monómeros que pueden hacerse corresponder con un polímero de ácido nucleico con ribosas (ARN) o de ácido nucleico con desoxirribosa (ADN), o análogo de los mismos. Lo anterior incluye los polímeros de nucleótidos tales como el ARN y el ADN, así como las formas modificadas de los mismos, ácidos péptido nucleicos (APNs), los ácidos nucleicos bloqueados (LNA TM) y similares.
50 En determinadas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluya múltiples tipos de monómero, por ejemplo subunidades tanto de ARN como de ADN. Un ácido nucleico puede ser o incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de una cadena o de doble cadena. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.
55

- 60 Un ácido nucleico típicamente es de una cadena o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se indica de manera general en la presente memoria, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage *et al.*, Tetrahedron 49(10):1925, 1993; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800, 1970; Sprinzl *et al.*, Eur. J. Biochem. 81:579, 1977; Letsinger *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:3487, 1986; Sawai *et al.*, Chem. Lett. 805, 1985; Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988, y Pauwels *et al.*, Chemica Scripta 26:1419, 1986), fosforotioato (Mag

et al., Nucleic Acids Res. 19:1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosoroamidita (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1992) y esqueletos y enlaces de ácidos péptido nucleicos (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895, 1992; Meier *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008, 1992; Nielsen, Nature 365:566, 1993; y Carlsson *et al.*, Nature 380:207, 1996). Entre otros ácidos nucleicos análogos se incluyen aquellos con esqueletos con carga positiva (Denpcy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097, 1995), esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; Angew, Chem. Intl. Ed. English 30:423, 1991; Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; Letsinger *et al.*, Nucleoside & Nucleotide 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", editores Y.S. Sanghvi y P. Dan Cock; Mesmaeker *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395, 1994; Jeff *et al.*, J. Biomolecular NMR 34:17, Tetrahedron Lett. 37:743, 1996) y esqueletos de no ribosa, incluyendo los descritos en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, editores Y. S. Sanghvi y P. Dan Cock. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos (Jenkins *et al.*, Chem. Soc. Rev., páginas 169 a 176, 1995). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. y E. News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de fracciones adicionales, tal como fracciones de marcaje, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácidos nucleicos también incluyen aquellos que presentan nucleótidos heterocíclicos u otros nucleótidos modificados de origen no natural, muchos de los cuales se describen, o de otro modo, se hace referencia a ellos, en la presente memoria. En particular, muchas bases no naturales se describen adicionalmente en, por ejemplo, Seela *et al.*, Helv. Chim. Acta 74:1790, 1991; Grein *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:971-976, 1994; y Seela *et al.*, Helv. Chim. Acta 82:1640, 1999. A título ilustrativo adicional, también se incluyen determinadas bases utilizadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (Tf). Por ejemplo, entre algunos de ellos se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo la 7-deazaguanina, la 7-deazaadenina, etc.), las pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303, titulada "Synthesis of 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleotides", publicada el 23 de noviembre de 1999, de Seela. Entre otras bases hetrocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de la 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de la adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, y similares.

También se describen ejemplos adicionales de nucleótidos modificados y nucleótidos en, por ejemplo, la patente US nº 5.484.908, titulada "Oligonucleotides containing 5-propynyl pyrimidines", publicada el 16 de junio de 1996, de Froehler *et al.*; la patente US nº 5.645.985, titulada "Enhanced triple-helix and double-helix formation with oligomers containing modified pyrimidines", publicada el 8 de julio de 1997, de Froehler *et al.*; la patente US nº 5.830.653, titulada "Methods of using oligomers containing modified pyrimidines", publicada el 3 de noviembre de 1998, de Froehler *et al.*; la patente US nº 6.639.059, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", publicada el 28 de octubre de 2003, de Kochkine *et al.*; la patente US nº 6.303.315, titulada "One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples", publicada el 16 de octubre de 2001, de Skouv, y la solicitud publicada de patente US nº 2003/0092905, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides", de Kochkine *et al.*, publicada el 15 de mayo de 2003.

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos 6 unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo nucleótidos), por ejemplo como mínimo 8, 10, 12 ó 15 unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo la función o utilización final del oligonucleótido. Típicamente, los monómeros de nucleótido se unen mediante enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos, incluyendo fosfortioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares, incluyendo los contraiones asociados, por ejemplo H⁺, NH₄⁺, Na⁺ y similares, en caso de encontrarse presentes dichos contraiones. Los oligonucleótidos opcionalmente se preparan mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directamente un método tal como el método del fosfortriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método del fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; el método del triéster de Matteucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981; los métodos de síntesis automática, o el método en soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, titulada "Process for preparing polynucleotides", publicada el 3 de julio de 1984, de Caruthers *et al.*, u otros métodos conocidos por el experto en la

materia.

La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a un enzima que es estable frente al calor (por ejemplo 90°C a 95°C), es resistente al calor y conserva suficiente actividad para llevar a cabo las reacciones de extensión de cebadores posteriores y que no resulta desnaturalizada (inactivada) irreversiblemente al someterla a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para llevar a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos son bien conocidas de la técnica y se ejemplifican en, por ejemplo, las patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195 y nº 4.965.188. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable resulta adecuada para la utilización en una reacción de ciclado térmico, tal como una reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para los fines de la presente memoria se refiere a una pérdida permanente y completa de la actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de la manera correcta para formar productos de extensión de cebador que son complementarios a una cadena molde de ácidos nucleicos. En tre las ADN polimerasas termoestables de bacterias termofílicas se incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus* especie sps17, *Thermus* especie Z05, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosipho africanus*. La expresión "actividad de exonucleasa 3' a 5'" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una actividad de algunas polimerasas que elimina la base más 3'-terminal de un ácido nucleico. Esta actividad en ocasiones se denomina en la técnica actividad "correctora" de una polimerasa. Una polimerasa que presente actividad de exonucleasa 3' a 5' es capaz de eliminar uno o más nucleótidos 3' de un oligonucleótido, es decir, de una manera secuencial. Los nucleótidos pueden sustituirse seguidamente por nucleótidos de una manera dependiente del molde, "editando" de esta manera los nucleótidos del oligonucleótido, es decir, sustituyendo nucleótidos que no son complementarios de un ácido nucleico molde por nucleótidos que son complementarios del molde.

La expresión "que no presenta sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5'" se refiere a una actividad de exonucleasa 3' a 5' que es inferior o igual a 3% (por ejemplo inferior a 1% ó 0,1%) de la actividad de una ADN polimerasa nativa de *Thermotoga maritima*. Entre las polimerasas ejemplares que no presentan sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5' se incluyen aquéllas indicadas en, por ejemplo, la patente US nº 7.148.049.

Un "nucleótido modificado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un nucleótido que no se encuentra naturalmente en el ADN genómico (por ejemplo un nucleótido sintético o un ribonucleótido). Tal como se describe en mayor detalle en la presente memoria, una base que presente una sustitución en la posición 2' de la parte de sacárido pentosa del nucleótido resulta en un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad 3' a 5' de las ADN polimerasas. Un "nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de un ácido nucleico polimerasa" se refiere a un nucleótido modificado que, cuando se encuentra en el extremo 3', o en la penúltima posición respecto al extremo 3' de un oligonucleótido, no resulta eliminado en presencia de una polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'.

Una "fracción 2'" de un nucleótido modificado se refiere a una fracción unida al carbono 2' de la parte sacárido del nucleótido, tal como se utiliza comúnmente en la técnica de los ácidos nucleicos. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente US nº 2006/0088855 y nº 2007/0219361.

Un ácido nucleico es "complementario" respecto a otro ácido nucleico en el caso de que por lo menos un segmento de ácido nucleico (es decir por lo menos dos bases contiguas) pueda combinarse en una asociación antiparalela o hibridarse con por lo menos una subsecuencia de otro ácido nucleico para formar un dúplex. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo en forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como en el caso de que dos o más ácidos nucleicos de una cadena se hibriden entre sí. En el contexto de la presente invención, para un oligonucleótido que es "complementario al 100%" respecto a una secuencia particular (por ejemplo un ácido nucleico molde), cada base del oligonucleótido es complementaria a las bases correspondientes en la secuencia particular de una manera antiparalela. Determinadas bases no presentes comúnmente en los ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos de la presente invención y pueden incluir, por ejemplo, inosina, 7-deazaguanina y los comentados anteriormente. En algunas realizaciones, la complementariedad no es perfecta, es decir, los ácidos nucleicos pueden ser "sustancialmente complementarios" en el caso de que presenten un "porcentaje de complementariedad" que indique que únicamente un determinado porcentaje de nucleótidos de un oligonucleótido es complementario a un molde, mientras que los nucleótidos restantes no son complementarios. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos sustancialmente complementarios de la presente invención (o las partes 3' de los mismos) son menos de 100% complementarios a un ácido nucleico molde, por ejemplo complementarios por lo menos al 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ó 95% respecto al molde. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligonucleótido (o por lo menos la parte 3' del oligonucleótido) presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó más desapareamientos con un ácido nucleico molde. En el caso típico, en el que el ácido nucleico molde es más largo que el oligonucleótido (o en donde se indique, una parte del mismo), el porcentaje o número de desapareamientos (o de nucleótidos complementarios) se determina con referencia a la subsecuencia

del ácido nucleico molde de la misma longitud que el oligonucleótido (o en donde se indique, una parte del mismo) con la proporción más alta de complementariedad de nucleótidos con el oligonucleótido (o parte del mismo en donde se indique).

5 Una "reacción de extensión de cebador" se refiere a una reacción molecular en la que una ácido nucleico polimerasa añade uno o más nucleótidos al extremo 3'-terminal de un cebador de una manera específica de molde. La extensión no sólo se refiere al primer nucleótido añadido al extremo 3'-terminal de un cebador, sino que también incluye cualquier extensión adicional de un polinucleótido formado por el cebador extendido.

10 Una "modificación covalente térmicamente reversible" de un enzima utilizado en la presente memoria se refiere a una modificación química reversible de un enzima, tal que el enzima inicialmente es sustancialmente inactivo a temperatura ambiente, pero en el que la modificación química (por ejemplo covalente) se libera a una temperatura más alta (por ejemplo superior a 50°C). Un ejemplo de una inactivación covalente térmicamente reversible implica la modificación química de los residuos de lisina, por ejemplo llevada a cabo mediante reacción con anhídridos de
15 ácido (ver la patente EP nº 0 962 526).

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra biológica" se refiere a cualquier sustancia que contiene o que se presume que contiene ácidos nucleicos (por ejemplo de una bacteria, virus, biopsia de tejido, etc.). La muestra puede obtenerse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia. Dicha muestra puede ser
20 una cantidad de tejido o líquido, o una fracción purificada del mismo, aislada de un individuo o individuos, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa, líquido espinal, saliva, líquido peritoneal, fluido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, productos sanguíneos, semen, líquido seminal, fluidos vaginales, efusión pulmonar, líquido seroso, órganos, lavado bronquioalveolar, tumores, tejidos incluidos en parafina, etc. Las muestras también pueden incluir constituyentes y
25 componentes de cultivos celulares *in vitro*, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, medio condicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc. Un ácido nucleico puede obtenerse de una muestra biológica mediante procedimientos bien conocidos de la técnica.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1 proporciona una ilustración esquemática de la edición de desapareamientos. Las dos Ts en la secuencia del cebador (subrayadas) se encuentran desapareadas con respecto a la diana. La ADN polimerasa elimina los desapareamientos en el cebador antes de extenderlo. El cebador resulta protegido de una degradación enzimática posterior por la modificación 2'-amino en la secuencia del cebador. Este procedimiento genera un
35 cebador que es perfectamente complementario a su diana.

Figura 2A proporciona cebadores (SEC ID nº 1 a 4) y moldes (SEC ID nº 5 a 8) utilizados en los ejemplos.

40 Figura 2B ilustra la acumulación de producto como función del número de ciclos para cebadores apareados y desapareados en reacciones de PCR que incluyen una polimerasa que no presenta sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5' (panel izquierdo) o que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5' (panel derecho).

45 Figura 2C ilustra la diferencia media de Ct para las reacciones que incluyen una polimerasa que no presenta sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5' ó que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'.

Figura 3 ilustra los valores medios de Ct de los cebadores apareados y desapareados utilizando diferentes enzimas y con o sin cebadores bencilados.

50 Figuras 4A-B ilustra el valor medio de Ct para cebadores apareados (A) y desapareados (B) para la secuencia diana de VIH utilizando únicamente una polimerasa que sustancialmente no presenta actividad de exonucleasa 3' a 5' ("nula") o que incluye además una cantidad de una polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'.

Descripción detallada de la invención

55 I. Introducción

La presente invención permite la detección de ácidos nucleicos diana (es decir, de molde) en una reacción de extensión de cebador en la que uno o más cebadores en la reacción son, o pueden ser, menos que perfectamente complementarios al ácido nucleico diana que debe amplificarse y detectarse. La presente invención resulta útil, por
60 ejemplo, en el diseño de cebadores para la amplificación y detección de una diversidad de dianas en la que una diversidad de secuencias relacionadas podría encontrarse en una secuencia diana. A título de ejemplo, la invención puede utilizarse para detectar patógenos víricos, en donde los patógenos víricos presentan suficiente variación en sus genomas para dificultar o imposibilitar el diseño de un solo cebador o conjunto reducido de cebadores que

amplificarán la mayoría o la totalidad de los posibles genomas víricos. El ácido nucleico diana o molde también puede derivarse de otras fuentes, por ejemplo de un genoma bacteriano.

5 La presente invención proporciona reacciones de amplificación cuantitativas en las que una polimerasa termoestable que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5' (en ocasiones denominada actividad correctora) se utiliza para amplificar una secuencia diana, por ejemplo un molde que puede presentar algunas variaciones de manera que uno o más cebadores oligonucleótidos utilizados en la amplificación no son totalmente complementarios a la diana. Pueden fijarse las condiciones de la PCR de manera que los cebadores conserven especificidad para la diana pero que, sin embargo, toleren algunas variaciones (por ejemplo 1, 2 ó 3 desapareamientos) de complementariedad entre el cebador o cebadores y el molde. La polimerasa bajo estas condiciones editará el oligonucleótido de manera que el producto de amplificación resultante sea totalmente complementario a la secuencia diana. Evidentemente se apreciará que los cebadores también pueden incluir uno o más nucleótidos en el extremo 5' del cebador que son no complementarios (por ejemplo para la clonación, el etiquetado de secuencias, el marcaje, etc.) y que por "totalmente complementario" se hace referencia a que los productos de reacción resultantes no incluyen ningún desapareamiento interno ó 3' que existía entre el cebador y el molde, pero que todavía puede incluir nucleótidos no complementarios 5' la función de los cuales es diferente de la hibridación con la diana.

En algunas realizaciones, el producto de PCR es más que un simple reacción de extensión de cebador (es decir, una reacción en la que el cebador se extiende en sólo 1 ó 2 nucleótidos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el producto de PCR presenta una longitud de por lo menos 10 nucleótidos, sin contar la secuencia oligonucleótida misma que también se incorpora en el producto.

En algunas realizaciones, la reacción incluye más de una polimerasa. En algunos casos, por lo menos una de las polimerasas sustancialmente no presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'. En estos casos, la proporción entre la cantidad de polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5' y la cantidad de polimerasa que no presenta sustancialmente dicha actividad puede variar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de polimerasa que presenta actividad de exonucleasa es inferior a la cantidad de polimerasa que no presenta sustancialmente la actividad, es decir, en algunas realizaciones, la proporción es inferior a 1:2, 1:3, 1:4 ó 1:10 (que presenta actividad/que no presenta sustancialmente actividad). Alternativamente, en algunas realizaciones, las cantidades de las polimerasas en la reacción son sustancialmente iguales y, en algunas realizaciones, existe más polimerasa con actividad de exonucleasa que polimerasa que no presenta sustancialmente la actividad.

En algunas realizaciones de la invención, se cuantifica la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra, por ejemplo utilizando amplificación cuantitativa. Opcionalmente, la cuantificación se lleva a cabo con independencia de la presencia o ausencia de desapareamientos entre los cebadores oligonucleótidos y el molde, ya que la información deseada es la presencia y cantidad de un posible molde variable que indica la presencia o ausencia de un patógeno, microbio, célula cancerosa, etc., y no qué secuencia se encuentra presente. Tras la determinación, la presencia o cantidad del molde puede correlacionarse con la presencia o cantidad de una entidad biológica, es decir, un virus, microbio, célula cancerosa, etc., a partir de la que se originó el molde.

La presente invención también proporciona oligonucleótidos que actúan como cebadores en reacciones de extensión de cebador. Mientras que típicamente las reacciones de extensión de cebador no implican la utilización de una polimerasa con actividad de exonucleasa 3' a 5' debido a la resultante falta de especificidad que puede producirse debido a la degradación del cebador debido a la actividad 3' a 5', la presente invención incluye por lo menos un enzima, por ejemplo una polimerasa, que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'. Sin embargo, para evitar la degradación del cebador, en algunas realizaciones, la presente invención incluye un nucleótido modificado en el centro del oligonucleótido cebador. Debido a que el nucleótido modificado no puede ser eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5', únicamente la parte 3' del cebador puede editarse con la actividad de exonucleasa 3' a 5'. Lo anterior permite el mantenimiento de cierta especificidad con la parte no degradada 5' del cebador y de esta manera permite la hibridación y extensión del cebador a pesar de los desapareamientos iniciales que pueden producirse entre la parte 3' del cebador y el molde potencialmente variable.

II. Nucleótidos modificados

55 La solicitud proporciona la utilización de cualquier tipo de nucleótido modificado con la condición de que la base evita la degradación sustancial de un oligonucleótido en presencia de una polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5' en el caso de que el nucleótido modificado se encuentre en el extremo 3' del oligonucleótido en presencia de un molde en el que la hibridación del oligonucleótido con el molde resulta en un desapareamiento entre el nucleótido modificado y el molde, en la que los nucleótidos modificados presentan una posición 2' modificada (es decir, en los que la posición 2' no es -H (ADN)), comprendiendo, aunque sin limitarse a ellos, los siguientes: 2'-amino, 2'-O-metilo, 2'-OH (ribo), 2'-O-fosfato y 2'-fosforotioato.

III. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos indicados por la invención puede ser de cualquier longitud que resulte conveniente para la utilización en reacciones de extensión de cebador. Los oligonucleótidos indicados presentan una longitud de por lo menos 8 nucleótidos y opcionalmente comprenden un nucleótido modificado que no se encuentra en el extremo 3' ó 5' del oligonucleótido. Los oligonucleótidos de la invención que incluyen un nucleótido modificado pueden describirse haciendo referencia a una parte 3' y 5', en la que la parte 3' se refiere a los nucleótidos situados 3' respecto al nucleótido modificado en el oligonucleótido y la parte 5' se refiere a los nucleótidos situados 5' respecto al nucleótido modificado en el oligonucleótido. Aparte del nucleótido modificado, tal como se indicad en la presente memoria, los nucleótidos restantes en el oligonucleótido pueden incluir nucleótidos naturales o sintéticos (pro ejemplo análogos de nucleótido) o una combinación de los mismos. Sin embargo, generalmente, la parte 3' del nucleótido no incluye nucleótidos que no puedan ser eliminados por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de una polimerasa.

La parte 5' del oligonucleótido puede ser cualquier secuencia. Por ejemplo, la parte 5' del oligonucleótido puede diseñarse para hibridarse (sola o en combinación con parte o la totalidad de la parte 3') en una reacción de extensión de cebador con un ácido nucleico diana (molde). En algunas realizaciones, en las que el ácido nucleico diana puede presentar cierta variación (por ejemplo un genoma vírico o bacterianos), la parte 5' puede diseñarse para hibridarse con una reacción de la secuencia diana que se encuentra por lo menos parcialmente conservada. Lo anterior puede conseguirse mediante, por ejemplo, el diseño de la parte 5' de manera que presente un número significativo de nucleótidos complementarios respecto a la diana, por ejemplo por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% complementarios respecto al ácido nucleico diana.

La longitud (es decir, el número de nucleótidos) de la parte 5' del oligonucleótido puede presentar cualquier longitud conveniente para la extensión del cebador. En algunas realizaciones, la parte 5' presenta por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó más nucleótidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la parte 5' presenta una longitud de 6 a 50 nucleótidos, por ejemplo, 10 a 20, 8 a 20, 15 a 50, 20 a 50, 25 a 50, 15 a 40 ó 20 a 40 nucleótidos.

La parte 3' del oligonucleótido también puede ser de cualquier longitud que resulte útil para la reacción de extensión de cebador. Debido a que la parte 3' puede editarse con la actividad de exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa, en algunas realizaciones, la parte 3' desempeñará un papel menos importante en el control de la especificidad de la reacción de extensión de cebador que la parte 5'. De esta manera, en algunas realizaciones, la longitud de la parte 3' será más corta que la parte 5'. De esta manera, por ejemplo, en algunas realizaciones, la parte 3' presenta una longitud de 1 a 15 nucleótidos, por ejemplo de 1 a 10, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, 2 a 10, 2 a 8, 2 a 5, 3 a 10 ó 3 a 8 nucleótidos. En algunas realizaciones, la parte 3' presenta una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó más nucleótidos.

Opcionalmente, los oligonucleótidos que deben utilizarse para la invención pueden marcarse o presentar otras fracciones unidas covalentemente o de otra manera. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención no incluyen un marcaje. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención no incluyen un marcaje fluorescente. En algunas realizaciones en las que se marcan los oligonucleótidos de la invención, puede utilizarse cualquier marcaje. Un oligonucleótido puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunquímicas, químicas u otras. A título ilustrativo, entre los marcajes útiles se incluyen los isótopos radioactivos, los pigmentos fluorescentes, los reactivos electrodenso, los enzimas (utilizados comúnmente en los ELISAs), la biotina o los haptenos y las proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de dichos marcajes y otros marcajes se describen adicionalmente en la presente memoria y/o son conocidos de la técnica.

En determinadas realizaciones de la invención, el marcaje es un pigmento fluorescente o fluoróforo. Típicamente, un fluoróforo particular puede emitir luz de una longitud de onda concreta tras la absorción de luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de la luz emitida por un fluoróforo particular es característica de dicho fluoróforo. De esta manera, un fluoróforo particular puede ser detectado mediante la detección de luz de una longitud de onda apropiada tras la excitación del fluoróforo con luz de longitud de onda más corta. Entre los marcajes fluorescentes pueden incluirse pigmentos con carga negativa, tales como pigmentos de la familia de la fluoresceína, o pigmentos con carga neutra, tales como pigmentos de la familia de la carboxirodamina, o pigmentos con carga positiva, tales como los pigmentos de la familia de la cianina o de la rodamina. Entre otras familias de pigmentos que pueden utilizarse en la invención se incluyen, por ejemplo, pigmentos de la familia de la polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina, pigmentos de la familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuaraina, pigmentos de la familia del lantánido quelado, pigmentos ALEXA FLUOR[®] y pigmentos de la familia BODIPY[®]. Entre los pigmentos de la familia de la fluoresceína se incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Entre los pigmentos de la familia de la carboxirodamina se incluyen el rojo Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA. Los pigmentos FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G y TAMRA son comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, Calif.), mientras que el rojo

Texas es comercializado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.). Entre los pigmentos de la familia de la cianina se incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7 y son comercializados por Amersham GE Healthcare (Piscataway, N.J.).

5 IV. Polimerasas con actividad de exonucleasa 3' a 5'

10 Puede utilizarse cualquier polimerasa que presente actividad de exonucleasa 3' a 5' tal como se describe en la presente memoria. Entre las polimerasas representativas que presentan actividad de exonucleasa 3' a 5' (incluyendo las polimerasas termoestables) se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de *Thermotoga maritima* (Tma [incluyendo, aunque sin limitación, Tma D323A, E325A], UITma, Tma25, etc. [ver, por ejemplo, la patente US nº 6.228.628]), las quimeras Tma/ZO5 (ver, por ejemplo, Schonbrunner *et al.*, Biochemistry 45:12786-12795, 2006), especies de *Pyrodictium*, incluyendo, aunque sin limitación, *Pyrodictium occultum* (poc) [formas 1 y 2] y *Pyrodictium abyssi* (Pab) [formas 1 y 2] y *Thermosiphon africanus* (Taf). Entre otras ADN polimerasas que contienen actividad de exonucleasa 3' a 5' se incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli* (ADN pol I de *E. coli*, fragmento Klenow), ADN polimerasa phi29; ADN polimerasa de T4; ADN polimerasa de T7; *Thermococcus litoralis* (Tli, también conocida como "Vent & Deep Vent"); *Pyrococcus furiosus* (Pfu); *Pyrococcus* sp. cepa KOD1; *Thermococcus* sp. TY; *Thermococcus* sp. 9^oN-7; *Methanococcus jannaschii*; *Bacillus caldolenax* (Bca); *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac); *Thermoplasma acidophilum* (Tac); *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth); *Thermococcus gorgonarius* (RAS Tgo). Entre las polimerasas comercialmente disponibles adicionales que presentan actividad de exonucleasa 3' a 5' se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las comercializadas por Invitrogen (por ejemplo AccuPrime™ que contiene ADN polimerasa Taq y una exonucleasa 3' a 5' que contiene ADN polimerasa derivada de la polimerasa de *Pyrococcus* especie GB-D; la ADN polimerasa Pfx50™ derivada de la arqueobacteria *Thermococcus zilligii*; la ADN polimerasa Accu-Prime™ Pfx derivada de *Thermococcus* sp. cepa KO), por Qiagen (por ejemplo HotStart™ y ProofStart™) y por Stratagene (ADN polimerasa EXL™, la ADN polimerasa Taq y el factor potenciador de la polimerasa Archae-Maxx®). Ver también la patente US nº 5.747.298.

15 En algunas realizaciones, las polimerasas utilizadas en la invención incluyen modificaciones de polimerasas nativas, de manera que las polimerasas presenten una actividad mejorada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las polimerasas han sido modificadas de manera que los nucleótidos marcados fluorescentemente se incorporen con una discriminación reducida respecto a los nucleótidos no marcados en comparación con la polimerasa nativa más estrechamente relacionada. Por ejemplo, la modificación del aminoácido en la "posición 4" tal como se describe en la publicación de patente US nº 2003/0152988 puede utilizarse para reducir la discriminación. Se describen otras mutaciones útiles en, por ejemplo, la patente US nº 7.148.049.

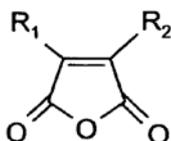
35 V. Modificaciones químicas reversibles

En algunas realizaciones, las polimerasas utilizadas en la invención comprenden una modificación reversible, de manera que la polimerasa presenta una actividad sustancialmente reducida hasta que la polimerasa se caliente a temperaturas suficientes para desnaturalizar el ADN, por ejemplo como mínimo 60°C y generalmente entre aproximadamente 80°C y 95°C. Dichas modificaciones resultan útiles para, por ejemplo, evitar la extensión no específica o la degradación de los sustratos ácidos nucleicos a temperatura ambiente.

40 En algunas realizaciones, las actividades de los enzimas se bloquean reversiblemente mediante una reacción entre los enzimas y un reactivo inhibidor, lo que resulta en la pérdida de la totalidad, o de prácticamente la totalidad (por ejemplo como mínimo 80%, por ejemplo como mínimo 90%) de la actividad del enzima. El reactivo inhibidor se selecciona de manera que la inhibición resulte reversible a temperaturas elevadas. En algunas realizaciones, el agente inhibidor es un anticuerpo que es capaz de inhibir uno de dichos enzimas termoestables. Opcionalmente, en lugar de utilizar un anticuerpo, el enzima puede resultar inhibido por otro agente inhibidor, lo que resulta en una modificación química reversible de la polimerasa. Tal como se describe en la presente invención, la inactivación reversible de los enzimas termoestables puede llevarse a cabo mediante la modificación química de los residuos de lisina. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la modificación química de la lisina con anhídridos ácidos (ver, por ejemplo, la patente EP nº 0 962 526, US nº 5.773.258). Sin embargo, la modificación química de otros residuos aminoácidos puede resultar en una proteína modificada con características adecuadas. Se han descrito varios compuestos en la literatura que reaccionan con grupos amino de una manera reversible. Por ejemplo, se han modificado reversiblemente grupos amino mediante trifluoroacetilación (ver Goldberger y Anfinsen, Biochemistry 1:410, 1962), amidinación (ver Hunter y Ludwig, J. Amer. Chem. Soc. 84:3491, 1962), malailación (ver Butler *et al.*, Biochem. J. 103:78, 1967), acetoacetilación (ver Marzotto *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 26:517, 1967; y Marzotto *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 154:450, 1968), tetrafluorosuccinilación (ver Branitzer *et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349:265, 1968), y citraconilación (ver Dixon y Perham, Biochem. J. 109:312-314, 1968) y Habeeb y Atassi, Biochemistry 9(25):4939-4944, 1970).

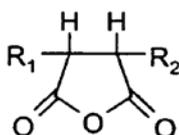
Son reactivos ejemplares para la modificación química del grupo ε-amino de los residuos de lisina, los anhídridos de ácido dicarboxílico. Ver la patente US nº 5.73.258 y la publicación de patente US nº 2004/0115639. Por lo tanto, en

algunas realizaciones, la polimerasa reversiblemente modificada se produce mediante una reacción de una mezcla del enzima y un reactivo modificador, en la que dicha reacción se lleva a cabo a pH alcalino a una temperatura que es inferior a aproximadamente 25°C, en la que dicho reactivo es un anhídrido dicarboxílico de fórmula general:



5

en la que R_1 y R_2 son hidrógenos o radicales orgánicos, que pueden encontrarse unidos, o son de la fórmula general:



10

en la que R_1 y R_2 son radicales orgánicos, que pueden encontrarse unidos, y el hidrógeno se encuentran en cis y en los que dicha reacción resulta en la inactivación esencialmente completa de la actividad enzimática.

15 El radical orgánico puede unirse directamente al anillo mediante un enlace carbono-carbono o mediante un enlace carbono-heteroátomo, tal como un enlace carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno o carbono-azufre. Los radicales orgánicos también pueden unirse entre sí formando una estructura de anillo tal como en, por ejemplo, anhídrido de 3,4,5,6-tetrahidroftálico.

20 Entre los ejemplos de reactivos ejemplares se incluyen anhídrido maleico, anhídridos maleicos sustituidos, tales como anhídrido citracónico, anhídrido cis-aconítico y anhídrido 2,3-dimetilmaleico; anhídrido exo-cis-3,6-endoxo-ídrido exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahidroftálico y anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico. Los reactivos se encuentran comercialmente disponibles de, por ejemplo, Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) o Spectrum Chemical Mfg. Corp (Gardena, Calif.).

25

V. Ácidos nucleicos de molde

Los ácidos nucleicos diana pueden proceder de una fuente biológica o sintética. La diana puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. Generalmente, en el caso de que se generen amplicones, estos están compuestos de ADN, aunque también pueden incorporarse ribonucleótidos o nucleótidos sintéticos en el amplicón. En el caso de que se desee detectar un ARN, el procedimiento de amplificación típicamente implica la utilización de transcripción inversa, incluyendo, por ejemplo, PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

35 Entre las secuencias diana específicas pueden incluirse, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos (por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV), el virus parvo B19, el virus de Epstein-Barr, el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus del Nilo Occidental (VNO), el virus de la encefalitis de St. Louis (VESL), el virus de la encefalitis Murray Valley y el virus Kunjin), ácidos nucleicos bacterianos (por ejemplo de *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia muridarum* o *Chlamydia trachomatis*), micobacterias, ácidos nucleicos fúngicos o ácidos nucleicos de animales o plantas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana son ácidos nucleicos animales (por ejemplo humanos) o se derivan de una muestra animal (por ejemplo humana) (es decir, pueden encontrarse presentes ácidos nucleicos víricos o de otro organismo patogénico en una muestra procedente de una biopsia animal, muestra de sangre, muestra de orina, muestra fecal, saliva, etc.). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana son, por ejemplo, regiones genéticas humanas que pueden incluir variantes asociadas a una enfermedad (por ejemplo cáncer, diabetes, etc.).

VI. Reacciones de extensión de cebador

Las condiciones de reacción de extensión de cebador generalmente se diseñan de manera que el oligonucleótido como todo se hibride con una secuencia diana aunque existan algunos desapareamientos entre el oligonucleótido y la diana. El experto en la materia apreciará que la temperatura de fusión de los cebadores y sondas puede determinarse y que la temperatura de amplificación puede controlarse de manera que permita alcanzar una temperatura suficientemente baja para el apareamiento del oligonucleótido aunque suficientemente alta para conseguir el nivel deseado de especificidad del cebador.

55

Las condiciones adecuadas para la extensión de un cebador son conocidas de la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*. Ver también Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (4a edición, John Wiley & Sons, 1999). Generalmente, se aparea un cebador, es decir, se hibrida con un ácido nucleico diana para formar un complejo de cebador-molde. El complejo de cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa y nucleótidos libres en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido complementario al ácido nucleico diana. Tal como se comenta en la presente memoria, antes de la extensión del cebador, uno o más nucleótidos de la parte 3' del oligonucleótido pueden ser cortados por la actividad correctora de la polimerasa. El cebador puede incluir, por ejemplo uno o más análogos de nucleótido. Además, los nucleótidos libres pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo ribonucleótidos o nucleótidos marcados), o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de extensión de cebador comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos utilizando una ADN polimerasa y una pareja de cebadores también son conocidas de la técnica (por ejemplo los métodos de amplificación por PCR). Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.*, editores, Academic Press, 1999). En otras realizaciones no mutuamente exclusivas, la reacción de extensión de cebador comprende la transcripción inversa de un molde de ARN (por ejemplo la RT-PCR). La utilización de las presentes polimerasas mutantes, que por ejemplo proporcionan una tasa de extensión mejorada o que mejoran de otra manera la reacción, por ejemplo proporcionando la capacidad de llevar a cabo dichas reacciones de extensión de cebador con tiempos de incubación relativamente cortos, concentraciones de enzima reducidas y/o un rendimiento de producto incrementado.

En algunas realizaciones, los cebadores que flanquean, pero que no se hibridan directamente con una posición SNP diana se utilizan en reacciones de extensión de cebador en las que los cebadores se hibridan con una región contigua a la posición SNP diana (es decir, 1, 2, 3 ó más nucleótidos del sitio SNP diana). Durante la reacción de extensión de cebador, un cebador típicamente no puede extenderse más allá de un sitio SNP diana en el caso de que se encuentre presente un nucleótido (alelo) particular en dicho sitio SNP diana, y el producto de extensión de cebador puede detectarse con el fin de determinar qué alelo SNP se encuentra presente en el sitio SNP diana. Por ejemplo, pueden utilizarse ddNTPs particulares en la reacción de extensión de cebador para terminar la extensión de cebador tras incorporar un ddNTP en el producto de extensión (por ejemplo un producto de extensión de cebador que incluye un ddNTP en el extremo más 3' del producto de extensión de cebador, y en el que el ddNTP es un nucleótido de un SNP que debe detectarse).

En determinadas realizaciones, se llevan a cabo reacciones de PCR en forma de procedimiento automatizado, que utiliza un enzima termoestable. En este procedimiento, la mezcla de reacción se cicla a través de una etapa de desnaturalización, una etapa de apareamiento de un cebador (y opcionalmente, una sonda) y una etapa de síntesis en la que el corte y desplazamiento se producen simultáneamente con la extensión de molde dependiente del cebador. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo utilizando un sistema. Opcionalmente, por ejemplo, pueden utilizarse cicladores térmicos, tales como los disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), que han sido diseñados para la utilización con enzimas termoestables.

La hibridación de cebadores o sondas con ácidos nucleicos diana puede llevarse a cabo mediante la selección de condiciones de hibridación apropiadas. La estabilidad del híbrido de oligonucleótido:ácido nucleico diana típicamente se selecciona que resulte compatible con las condiciones de ensayo y de lavado, de manera que se formen híbridos detectables estables únicamente entre cebadores/sondas y los ácidos nucleicos diana. La manipulación de uno o más de los diferentes parámetros de ensayo determina la sensibilidad y especificidad exactas de un ensayo de hibridación particular.

Más concretamente, la hibridación entre bases complementarias de ADN, ARN, APN o combinaciones de ADN, ARN y APN se produce bajo una amplia diversidad de condiciones variables de temperatura, concentración salina, fuerza electrostática, composición del tampón y similares. Se describen ejemplos de dichas condiciones y métodos para la aplicación de las mismas en, por ejemplo, Tijssen, Hybridization with Nucleic Acids Probes, vol. 24, Elsevier Science, 1993, y en Hames y Higgins, *supra*. La hibridación generalmente tiene lugar a una temperatura de entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C, durante periodos de entre aproximadamente un minuto y aproximadamente una hora, dependiendo de la naturaleza de la secuencia que debe hibridarse y la longitud de la misma. Sin embargo, se reconoce que las hibridaciones pueden producirse en segundos u horas, dependiendo de las condiciones de la reacción. A título ilustrativo, las condiciones de hibridación típicas para una mezcla de dos 2-meros es llevar la mezcla a 68°C, seguido del enfriamiento hasta la temperatura ambiente (22°C) durante cinco minutos o a temperaturas muy bajas, tales como 2°C, en 2 microlitros. La hibridación entre ácidos nucleicos puede resultar facilitada por la utilización de tampones tales como Tris-EDTA (TE), Tris-HCl y HEPES, soluciones salinas (por ejemplo de NaCl, KCl o CaCl₂) u otras soluciones acuosas, reactivos y compuestos químicos. Entre los ejemplos de estos reactivos se incluyen proteínas de unión de una cadena, tales como la proteína Rec A, la proteína del gen 32 de T4, la proteína de unión de una cadena de *E. coli* y las proteínas de unión a surcos mayores o

menores de los ácidos nucleicos. Entre otros ejemplos de dichos reactivos y compuestos químicos se incluyen los iones divalentes, los iones polivalentes y las sustancias intercalantes, tales como el bromuro de etidio, la actinomicina D, el psoralén y la angelicina.

5 En algunas realizaciones, se realiza un seguimiento de la reacción de extensión de cebador (por ejemplo incluyendo la PCR) "en tiempo real" y opcionalmente es cuantitativa. Ver, por ejemplo, Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Scientific Press, 2004; Innis *et al.* (editores). Los métodos de amplificación cuantitativa se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 6.180.349, nº 6.033.854 y nº 5.972.602, así como en, por ejemplo, Gibson *et al.*, Genome Research 6:995-1001, 1996; DeGraves *et al.*, Biotechniques 34(1):106-10, 112-5, 2003; Deiman B. *et al.*, Mol. Biotechnol. 20(2):163-79, 2002.

15 Con el fin de cuantificar la cantidad de ARN específico en una muestra, puede generarse una curva estándar a partir de la transcripción no iniciada de un plásmido que contiene el gen de interés. Pueden generarse curvas estándares utilizando valores umbral (Ct) determinados en la PCR en tiempo real, los cuales se relacionan con la concentración inicial de ADNc utilizada en el ensayo. Además, puede generarse una curva estándar para un polinucleótido estándar (por ejemplo una secuencia previamente cuantificada). Lo anterior permite estandarizar el contenido inicial de ARN de una muestra biológica respecto a la cantidad de estándar con fines comparativos. Ver, por ejemplo, The PCR technique: quantitative PCR (J. Larrick, editor, 1997).

20 Puede utilizarse cualquier método de detección de productos de extensión de cebador (incluyendo de amplificación). En algunas realizaciones se utilizan una sonda de ácidos nucleicos marcada que se une específicamente (es decir, se hibrida) con el producto de reacción, con el fin de detectar la acumulación del producto. Un método para la detección de productos de amplificación es el ensayo de PCR de 5' nucleasa (utilizando, por ejemplo, COBAS TaqMan 48 Analyzer™ (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Ver, por ejemplo, Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, 1991; Lee *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:3761-3766, 1993; patentes US nº 6.214.979, nº 5.804.375, nº 5.487.972 y nº 5.210.015. Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico mediante hibridación y el corte de una sonda fluorogénica doblemente marcada durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica puede consistir de un oligonucleótido (por ejemplo que se hibrida con un ácido nucleico diana deseado o su complemento) marcado con un pigmento informador fluorescente y un pigmento inhibidor. Durante la PCR, esta sonda resulta cortada por la actividad de 5' nucleasa de la ADN polimerasa si y sólo si se hibrida con el segmento que se está amplificando. El corte de la sonda genera un incremento de la intensidad de fluorescencia del pigmento informador.

35 Otro método para detectar los productos de amplificación basado en la utilización de la transferencia energética es el método de la "sonda de baliza molecular" descrito por Tyagi y Kramer (Nature Biotech. 14:303-309, 1996), que también es el objeto de las patentes US nº 5.119.801 y nº 5.312.728. Este método utiliza sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formarse estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (el extremo 5' ó 3') existe un fluoróforo donante, y en el otro extremo, una fracción aceptora. En el caso del método de Tyagi y Kramer, esta fracción aceptora es un inhibidor, es decir, el aceptor absorbe la energía liberada por el donante, pero seguidamente no emite fluorescencia ella misma. De esta manera, cuando la baliza se encuentra en la conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que cuando la baliza se encuentra en la conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se encuentra inhibida. Al utilizarla en la PCR, la sonda de baliza molecular, que se hibrida con una de las cadenas del producto de PCR, se encuentra en la "conformación abierta" y se detecta fluorescencia, mientras que aquéllas que permanecen en estado no hibridado no emiten fluorescencia (Tyagi y Kramer, Nature Biotechnol. 14:303-306, 1996). Como resultado, se incrementa la cantidad de fluorescencia a medida que se incrementa la cantidad de producto de PCR, y de esta manera puede utilizarse como medida del progreso del a PCR.

50 Entre otros tipos de sonda que resultan útiles para la PCR en tiempo real se incluyen las sondas Scorpion™, que se encuentran disponibles en formatos "uni-marcaje" y "bi-marcaje" de Prologo, C (Boulder, CO). Ver también Bates *et al.*, Mol. Plant Pathol. 2(5):275-280, 2001. El experto en la materia reconocerá que también se encuentran disponibles otros métodos de amplificación cuantitativa.

55 VII. Mezclas de reacción

La presente invención también proporciona mezclas de reacción de los reactivos tal como se describe en la presente memoria. Las mezclas de reacción pueden comprender, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa y que no se encuentra en el extremo 3' ó 5' del oligonucleótido. Preferentemente, el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido. Las realizaciones específicas de los oligonucleótidos, preferentemente de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud, descritas en la presente memoria se contempla específicamente que se encuentren opcionalmente incluidas en las mezclas de reacción de la invención. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a

5'.

Opcionalmente, la mezcla de reacción también comprende una muestra biológica (por ejemplo ácidos nucleicos de un organismo). En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden un ácido nucleico molde. En algunas realizaciones, la parte 3' del oligonucleótido es complementaria al 70%-100% al ácido nucleico molde o complementaria al molde indicado en la presente memoria.

VIII. Kits

La presente invención también proporciona kits que comprenden uno o más reactivos indicados en la presente memoria. En algunas realizaciones, los kits comprenden, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa y que no se encuentra en el extremo 3' ó 5' del oligonucleótido. Preferentemente, el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido. Las realizaciones específicas de los oligonucleótidos, preferentemente de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud descritas en la presente memoria se contemplan específicamente que se encuentren opcionalmente incluidas en los kits de la invención. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'. Los kits de la invención opcionalmente pueden incluir instrucciones de utilización. Dichas instrucciones pueden encontrarse en formato de papel, electrónico (por ejemplo en un CD-ROM o DVD) o en otro formato.

IX. Sistemas

En algunas realizaciones, la invención se refiere a sistemas integrados para llevar a cabo y/o detectar los resultados de las reacciones de extensión de cebador de la presente invención. Los sistemas pueden incluir instrumentos y medios para interpretar y analizar los datos recogidos, especialmente en el caso de que los medios para derivar los resultados de las reacciones de extensión de cebador comprendan algoritmos y/o información almacenada electrónicamente (por ejemplo datos de fluorescencia recogidos, opciones predeterminadas para los productos de extensión, etc.). Cada parte de un sistema integrado puede encontrarse funcionalmente interconectada y, en algunos casos, físicamente conectada. En algunas realizaciones, el sistema integrado es automático, en el que no existe necesidad de ninguna manipulación de la muestra o de los instrumentos por parte de un operador tras el inicio del análisis.

Un sistema de la invención puede incluir instrumentos. Por ejemplo, la invención puede incluir un detector, tal como un detector de fluorescencia (por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia). Puede utilizarse un detector o detectores conjuntamente con la invención, por ejemplo para seguir/medir las reacciones de extensión de cebador, por ejemplo medidas como un cambio de fluorescencia. Un detector puede presentar la forma de un lector de placas multipocillo para facilitar la capacidad de alto rendimiento del ensayo.

En algunas realizaciones, el sistema integrado incluye un dispositivo de ciclado térmico, o termociclador, para el propósito de controlar la temperatura de la reacción. En algunas realizaciones, el dispositivo de ciclado térmico y el detector son un instrumento integrado, en el que el ciclado térmico y la detección de la emisión (por ejemplo la detección de la fluorescencia) se realizan en el mismo dispositivo.

Un detector, por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia, puede conectarse a un ordenador que controla los parámetros de funcionamiento del espectrofotómetro (por ejemplo la longitud de onda de excitación o la longitud de onda de la emisión detectada o ambas) y/o para el almacenamiento de los datos recogidos desde el detector (por ejemplo mediciones de fluorescencia durante los ciclos de amplificación). El ordenador también puede conectarse operablemente al dispositivo de ciclado térmico para controlar la temperatura, programación y/o tasa de cambio de la temperatura del sistema. El ordenador integrado también puede contener el "módulo de correlación", en el que los datos recogidos desde el detector se analizan (electrónicamente). En algunas realizaciones, el módulo de correlación comprende un programa informático para el análisis de los datos generados, por ejemplo para determinar la presencia o ausencia de un patógeno vírico o de otro tipo, o la presencia o ausencia de un SNP u otra diana potencial que debe detectarse, por ejemplo mediante la comparación de los datos generados con una base de datos de posibles resultados.

En algunas realizaciones, los detectores se estructuran para detectar las señales detectables que son producidas, por ejemplo, en otro componente o en una posición próxima a otro componente del sistema de ensayo dado (por ejemplo en un recipiente, sobre un soporte sólido, etc.). Los detectores de señales adecuados que se utilizan opcionalmente, o que han sido adaptados para su utilización, en la presente memoria detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, absorbancia, índice refractivo, luminiscencia, masa o similares. Los detectores opcionalmente siguen una o una pluralidad de señales antes y/o después de la realización de, por ejemplo, una etapa de ensayo dada. Por ejemplo, los detectores opcionalmente realizan un seguimiento de una pluralidad de señales ópticas, que corresponden ordenadamente a resultados "en tiempo real". Entre los detectores o sensores ejemplares se incluyen tubos fotomultiplicadores, matrices de CCD, sensores ópticos, sensores de

temperatura, sensores de presión, sensores de pH, sensores de conductividad, detectores de escaneo, o similares. Entre los detectores ejemplares más específicos que se utilizan opcionalmente en la realización de los métodos de la invención se incluyen, por ejemplo, detectores de dispersión lumínica por resonancia, espectroscopios de emisión, espectroscopios de fluorescencia, espectroscopios de fosforescencia, espectroscopios de luminiscencia, espectrofotómetros, fotómetros y similares. También se describen detectores en, por ejemplo, Skoog *et al.*, Principles of Instrumental Analysis, 5a edición, Harcourt Brace College Publishers, 1998, y Currell, Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality, John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Los sistemas de la invención también incluyen típicamente controladores que se conectan operablemente a uno o más componentes (por ejemplo detectores, moduladores térmicos, componentes de transferencia de fluidos, etc.) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Más concretamente, se incluyen controladores generalmente como componentes del sistema separados o integrados que se utilizan, por ejemplo, para recibir datos desde los detectores, para llevar a cabo y/o regular la temperatura en los recipientes, para llevar a cabo y/o regular el flujo de fluidos hacia o desde recipientes seleccionados, o similares. Los controladores y/o otros componentes del sistema se acoplan opcionalmente con un procesador programado apropiadamente, ordenador, dispositivo digital u otro dispositivo informático (por ejemplo incluyendo un conversor analógico a digital o digital a analógico, según resulte necesario) que funciona ordenando el funcionamiento de dichos instrumentos según las instrucciones programadas previamente o según las entradas del usuario, recibiendo datos e información de dichos instrumentos, e interpretando, manipulando y transmitiendo esta información al usuario. Los controladores adecuados son generalmente conocidos de la técnica y se encuentran disponibles de diversas fuentes comerciales.

Cualquier controlador u ordenador opcionalmente incluye un monitor, que con frecuencia es una pantalla de tubo de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla plana (por ejemplo una pantalla de cristal líquido de matriz activa, una pantalla de cristal líquido, etc.) u otras. Los circuitos de ordenador con frecuencia se introducen en una caja, que incluye numerosos chips de circuito integrado, tales como microprocesadores, memoria, circuitos de interfaz, y otros. La caja opcionalmente también incluye un disco duro, una unidad de disco, una unidad extraíble de alta capacidad, tal como un CD-ROM grabable, y otros elementos periféricos habituales. Los dispositivos de entrada, tales como un teclado o un ratón, opcionalmente permiten la introducción de información por parte de un usuario. Estos componentes se ilustran adicionalmente después.

El ordenador típicamente incluye programas informáticos apropiados para recibir instrucciones del usuario, en forma de entradas del usuario en un conjunto de campos de parámetros, por ejemplo en un GUI, o en forma de instrucciones programadas previamente, por ejemplo programadas previamente para una diversidad de diferentes operaciones específicas. A continuación, el programa informático convierte dichas instrucciones en lenguaje apropiado para ordenar que uno o más controladores lleve a cabo la operación deseada. Seguidamente el ordenador recibe los datos de, por ejemplo, sensores/detectores incluidos dentro del sistema e interpreta los datos, los proporciona en un formato comprensible para el usuario o utiliza dichos datos para iniciar instrucciones adicionales del controlador, según la programación, por ejemplo el control de reguladores del flujo de fluidos en respuesta a datos de pesos de fluido recibidos de balanzas de peso o similares.

Ejemplo

Las ADN polimerasa utilizadas generalmente para la PCR y RT/PCR tienden a presentar dificultades para amplificar dianas con desapareamiento en posiciones próximas al extremo 3' de los cebadores. Desafortunadamente esto se observa habitualmente para dianas que presentan una heterogeneidad de secuencias significativa, tal como las dianas en los ensayos diagnósticos de VIH y de VHC. La capacidad reducida de la ADN polimerasa de extender desapareamientos en el extremo 3' es todavía más pronunciada en el caso de que los cebadores se hayan modificado mediante alquilación. La alquilación de los cebadores reduce los efectos de cebador/dímero (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.001.611 y nº 6.794.142); sin embargo, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo sin cebadores alquilados. Un método para minimizar el impacto de estos desapareamientos terminales es eliminar los desapareamientos por completo antes de extender el cebador oligonucleótido. Los presentes inventores han evaluado la utilización de ADN polimerasas con actividad (correctora) de exonucleasa 3' a 5' modulada para reducir la intolerancia a los desapareamientos en una comparación con enzimas que no presentan actividad correctora. La actividad correctora de las ADN polimerasas puede bloquearse mediante la utilización de bases modificadas en el grupo 2'-amino de la secuencia del cebador. Los presentes inventores han manipulado cebadores con dichos grupos de bloqueo con el fin de proporcionar el grado deseado de degradación de la actividad correctora. Los cebadores se diseñaron con la modificación de 2'-amino en la penúltima base (para bloquear totalmente la actividad correctora) o cadena arriba de potenciales desapareamientos en el extremo 3' (para permitir la actividad correctora del extremo 3' pero sin permitir que el enzima degrade el oligonucleótido adicionalmente). Los resultados de estos estudios demuestran que la actividad correctora permite que las ADN polimerasas amplifiquen eficientemente dichas dianas desapareadas. De esta manera, los presentes inventores han demostrado un enfoque que mejora el rendimiento de los sistemas de amplificación que presentan la dificultad añadida de la heterogeneidad de las secuencia bajo los cebadores oligonucleótidos.

La ADN polimerasa quimérica CS5 se creó mediante la combinación del dominio exonucleasa 5' a 3' de *Thermus* sp. Z05 y los dominios de exonucleasa 3' a 5' y de ADN polimerasa de *Thermatoga maritima* (ver Schonbrunner *et al.*, Biochemistry 45:12786-12795, 2006). Se utilizó esta ADN polimerasa para crear una colección de ADN polimerasas mutantes quiméricas con actividad correctora atenuada, en la que CS5L (CS5 con la mutación L329A) conserva aproximadamente 10% de la actividad correctora y CS6 presenta una actividad correctora nula (ver Schonbrunner *et al.*, Biochemistry 45:12786-12795, 2006). En una segunda ronda de mutagénesis, se seleccionaron enzimas con tasas de extensión mejoradas en un molde de ADN de M13 con cebadores en presencia de SYBR Verde. Algunos de estos mutante CS5L mostraban la capacidad de llevar a cabo una RT/PCR prolongada y sensible. La mutación más prometedora era D640G. Los presentes inventores transfirieron estas mutaciones desde el esqueleto de la ADN polimerasa CS5 a los dominios de exonucleasa 3' a 5' y de ADN polimerasa de la ADN polimerasa de Tma de tipo salvaje. Las ADN polimerasas Tma6D y TmaLD contienen la mutación D640G "extensor más rápido" pero Tma6D presenta una actividad correctora nula y TmaLD presenta una actividad correctora reducida. De manera similar, los presentes inventores transfirieron la mutación homóloga D640G del dominio de ADN polimerasa de CS5 a Z05 (D580G).

La actividad correcta de las ADN polimerasas se limita mediante la utilización de bases modificadas en el grupo 2'-amino en la secuencia de los cebadores. Se diseñaron cebadores con la modificación 2'-amino en la penúltima base (para bloquear por completo la actividad correctora) o en la posición N-6 del cebador situada cadena arriba de potenciales desapareamientos en el extremo 3' (para permitir una actividad correctora limitada). Se compararon estos cebadores con cebadores alquilados que no presentaban modificaciones 2'-amino. Se evaluó la utilización de enzimas con actividad correctora modulada y la utilización de ADN polimerasas nuevas para mitigar la reducción de rendimiento provocada por los desapareamientos en los extremo 3' de los cebadores.

Actividad enzimática

La figura 1 proporciona una ilustración esquemática de la edición de desapareamientos. Las dos Ts en la secuencia de los cebadores se encuentran desapareadas con la diana. La ADN polimerasa elimina los desapareamientos en el cebador antes de extenderlo. El cebador se encuentra protegido de la degradación enzimática adicional por la modificación 2'-amino en la secuencia del cebador. Este procedimiento genera un cebador perfectamente apareado con su diana.

RT/PCR de dianas apareadas y desapareadas

La figura 2A muestra los cebadores y moldes utilizados para la amplificación de la región GAG del VIH. La figura 2B muestra los resultados de la RT/PCR del VIH (SYBR Verde) con una etapa de RT de 15 minutos utilizando un transcrito perfectamente apareado (en la parte 3') o un transcrito desapareado (T97599-1). Las modificaciones 2' amino del cebador de RT se encontraban en la penúltima posición (-1) o en la posición N-6 del extremo 3' del cebador.

La ADN polimerasa Tma6D (sin actividad correctora) presenta un retraso de -8 Ct para la diana desapareado con los cebadores que presentan modificaciones en los 2'-amino (-1 y -6). La ADN polimerasa correcta TmaLD presenta un retraso de ~6 ciclos con la diana desapareada con el cebador -1 modificado con 2'-amino pero un retraso inferior a 1 ciclo con el cebador -6 modificado con amino (el grupo 2'-amino cadena arriba de los desapareamientos). Las diferencias de Ct también se ilustran en la figura 2C.

Amplificación con cebadores modificados con alquilo

La dificultad de extender desapareamientos en el extremo 3' se ve exacerbada por la modificación de los cebadores con grupos bencilo (que provocan un mayor retraso del Ct) (ver la figura 3). La ADN polimerasa Tma6D muestra un retraso de ~15 ciclos con la diana desapareada utilizando un cebador bencilado, mientras que la ADN polimerasa correctora TmaLD muestra un retraso <1 ciclo. La ADN polimerasa TmaL (también un enzima corrector) muestra un retraso de ~7 ciclos para la diana desapareada. Estos resultados sugieren que la actividad correctora es responsable de la mejora de la amplificación de la diana desapareada y que la mutación D640G en Tma la mejoró adicionalmente. Estos resultados confirman que los cebadores alquilados resultan degradados por la actividad (correctora) de exonucleasa 3' a 5' de una ADN polimerasa.

Adición de enzima corrector a MMX de VIH-1

Los enzimas correctores CS5G o CS5GL se pulsaron en la mezcla de reacción fabricada del ensayo de VIH-1 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan. Se consiguieron resultados favorables al añadir 0,1 U de ADN polimerasa de CS5G ó 1 U de ADN polimerasa CS5GL (ver las figuras 4A y 4B). Utilizando la diana desapareada T97599-1, la adición de 0,1 U de ADN polimerasa CS5G ó 1 U de ADN polimerasa CS5GL mostró un Ct 8,5 a 11,6 ciclos anterior al de la ADN polimerasa Z05 por sí sola. El estándar de cuantificación (QS) mostró un Ct 2,1 a 3,9 ciclos anterior,

respectivamente. De esta manera, la adición de un enzima corrector conduce a una determinación más exacta del número de copia de este transcrito desapareado. Con la diana apareada, EF021, los resultados indican que la adición provocó pocos cambios en la cuantificación.

5 Conclusiones

10 Los presentes inventores han demostrado múltiples enfoques para mejorar el rendimiento de los sistemas de amplificación con la dificultad añadida de moldes desapareados. La actividad correctora de una ADN polimerasa (por ejemplo TmaLD) se ha demostrado que amplifica con éxito dianas con desapareamientos en el extremo 3' de los cebadores. Al utilizar cebadores con nucleótidos modificados con 2'-amino que restringen el grado de corrección, es decir, en la penúltima posición de la secuencia del cebador, la amplificación funcionó como si se hubiese utilizado una ADN polimerasa no correctora (comparable a Tma6D). Sin embargo, en el caso de que la modificación de 2'-amino se encontrase situada cadena arriba de los desapareamientos, la degradación más allá de los desapareamientos hasta una posición situada a una base del grupo 2'-amino proporcionó un cebador perfectamente complementario a su diana y de esta manera mejoró la amplificación.

15 Las modificaciones con alquilo exacerban la dificultad de extender los desapareamientos en 3' (provocando un retraso de Ct más grande). Estos resultados sugieren que la actividad correctora es responsable de mejorar la amplificación de la diana desapareada y que la mutación D640G en Tma (D580G en Z05) la mejoró adicionalmente. Estos resultados confirman que los cebadores bencilados resultan degradados por la actividad de exonucleasa 3' a 5' (correctora) de una ADN polimerasa.

20 La adición de un enzima corrector a los ensayos TaqMan víricos basados en Z05 actuales podría ser una solución para mejorar el rendimiento de los sistemas de amplificación existentes dificultados por la heterogeneidad de las secuencias bajo los cebadores oligonucleótidos.

25 Las mutaciones específicas caracterizadas en las ADN polimerasas de Tma y Z05 podrían proporcionar un doble beneficio en sistemas que utilizan cebadores alquilados en el caso de que aparezca un molde desapareado. La mutación D640G en la ADN polimerasa de Tma y las mutaciones en la posición D580 en la ADN polimerasa Z05 (tal como Z05D) mejoran la extensión de los cebadores modificados en 3' y mejoran la tolerancia a los desapareamientos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 Roche Diagnostics GmbH
 5 <120> Extensión correctora de cebadores
 <130> 24614 WO-KOE
 10 <140> Todavía no asignado
 <141> Todavía no asignado
 <150> US 61/188.841
 <151> 2008-08-12
 15 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.3
 20 <210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador cadena arriba en la región GAG del VIH
 <220>
 <221> modified_base
 30 <222> (26)..(26)
 <223> n = 2'-amino (ribo) c (E)
 <400> 1
 agtgggggga catcaagcag ccatgnaaa 29
 35 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador de RT en la región GAG del VIH
 <220>
 45 <221> modified_base
 <222> (29) .. (29)
 <223> n = 2'-amino (ribo) c (E)
 <400> 2
 50 ggtactagta gttcctgcta tgcactnc 30
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de RT en la región GAG del VIH
 60 <220>
 <221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> n = 2'-amino (ribo) c (E)

ES 2 384 681 T3

<400> 3
ggtactagta gttcctgcta tgnacttcc 30

5 <210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador de RT en la región GAG del VIH

15 <220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> n = 2'-amino (ribo) c (E)

20 <220>
<221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> n = etil-desoxi c (P)

25 <220>
<221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> n = t-butil bencil desoxi c (Q)

<400> 4
ggtactagta gttcctgcta tgnactnn 30

30 <210> 4
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> molde de transcripción complementario al cebador situado cadena arriba de la región GAG del VIH

40 <400> 5
tttgcattgc tgcttgatg cccccact 29

45 <210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> molde de transcripción complementario al cebador de RT en la región GAG del VIH

55 <400> 6
ggaagtgaca tagcaggaac tactagtacc 30

60 <210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> molde de transcripción desapareado respecto al cebador de RT en la región GAG del VIH

60 <400> 7
tttgcattgc tgcttgatgg cccccaact 29

<210> 8

ES 2 384 681 T3

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> molde de transcripción desapareado respecto al cebador de RT en la región GAG del VIH

<400> 8
10 ggccgtgaca tagcaggaac tactagtacc 30

REIVINDICACIONES

1. Método de realización de una reacción de extensión de cebador, comprendiendo el método:
- 5 a. poner en contacto un oligonucleótico con: (i) un ácido nucleico molde, e (ii) una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad exonucleasa 3' a 5', en la que:
- i. el oligonucleótido comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad exonucleasa 3' a 5',
- 10 ii. el nucleótido modificado no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido,
- iii. el oligonucleótido presenta una parte 3' y una parte 5', en el que la parte 3' comprende los nucleótidos del oligonucleótido que se encuentran en el lado 3' del nucleótido modificado y la parte 5' comprende los nucleótidos del oligonucleótido que se encuentran en el lado 5' del nucleótido modificado, y
- 15 iv. la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para permitir que la polimerasa edite la parte 3' del oligonucleótido de una manera específica de molde en el caso de que la parte 3' del oligonucleótido no sea 100% complementaria al ácido nucleico molde, y
- b. llevar a cabo una reacción de extensión de cebador mediante la extensión del oligonucleótido de un modo dependiente de molde, en la que el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que el nucleótido modificado se encuentra 2 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el nucleótido modificado no comprende una fracción fluorescente.
- 25 4. Mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido, comprendiendo el oligonucleótido un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de una ácido nucleico polimerasa, en la que el nucleótido modificado no es el nucleótido 3' ó 5'-terminal ni el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, y el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato, pero no comprende una fracción fluorescente, y que comprende una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'.
- 30 5. Mezcla de reacción según la reivindicación 4, que comprende además un ácido nucleico molde.
- 35 6. Kit que comprende un oligonucleotido, comprendiendo el oligonucleótido un nucleótido modificado que no resuta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' de una ácido nucleico polimerasa, en el que el nucleótido modificado no es el nucleótido 3' ó 5'-terminal ni en el penúltimo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido y el nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato, pero no comprende una fracción fluorescente, y que comprende además una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'.
- 40 7. Kit según la reivindicación 6, en el que el nucleótido modificado se encuentra 3 a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.
- 45 8. Método para detectar la presencia, ausencia o cantidad de una entidad biológica en una muestra biológica, comprendiendo el método:
- a. poner en contacto un oligonucleótido con (i) una muestra biológica que se sospecha que presenta un ácido nucleico de la entidad biológica, e (ii) una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 3' a 5', en el que el oligonucleótido comprende un nucleótido modificado que no resulta eliminado por la actividad de exonucleasa 3' a 5' y que no es el nucleótido 3'-terminal ó 5'-terminal ni en el penúltimo nucleótido desde el extremo 3' del oligonucleótido, y en el que dicho nucleótido modificado comprende una fracción 2' seleccionada de entre el grupo que consiste de amino, O-metilo, O-fosfato y fosforotioato y en el que el oligonucleótido es sustancialmente complementario al ácido nucleico de la entidad biológica,
- 50 b. llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, extendiendo de esta manera el oligonucleótido de una manera dependiente de molde para producir un producto polinucleótido complementario al ácido nucleico de la entidad biológica,
- 55 c. cuantificar el producto polinucleótido, o el complemento del mismo, y
- d. correlacionar la cantidad de producto polinucleótido, o complemento del mismo, con la cantidad o presencia o ausencia de la entidad biológica en la muestra biológica.
- 60 9. Método según la reivindicación 8, en el que la etapa de cuantificación comprende una PCR en tiempo real cuantitativa.

- 5 10. Método según la reivindicación 8, en el que la PCR comprende una etapa bajo condiciones que permiten la extensión del oligonucleótido con cero, uno, dos o tres desapareamientos entre el oligonucleótido y el ácido nucleico vírico y en el que el oligonucleótido presenta uno o más desapareamientos con el ácido nucleico de la entidad biológica y en el que la actividad de exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa edita el oligonucleótido resultando en un producto polinucleótido que es totalmente complementario al producto polinucleótido.
11. Método según la reivindicación 8, en el que la etapa de ejecución comprende además una o más polimerasas, algunas de las cuales no presentan sustancialmente actividad de exonucleasa 3' a 5'.

FIG. 1

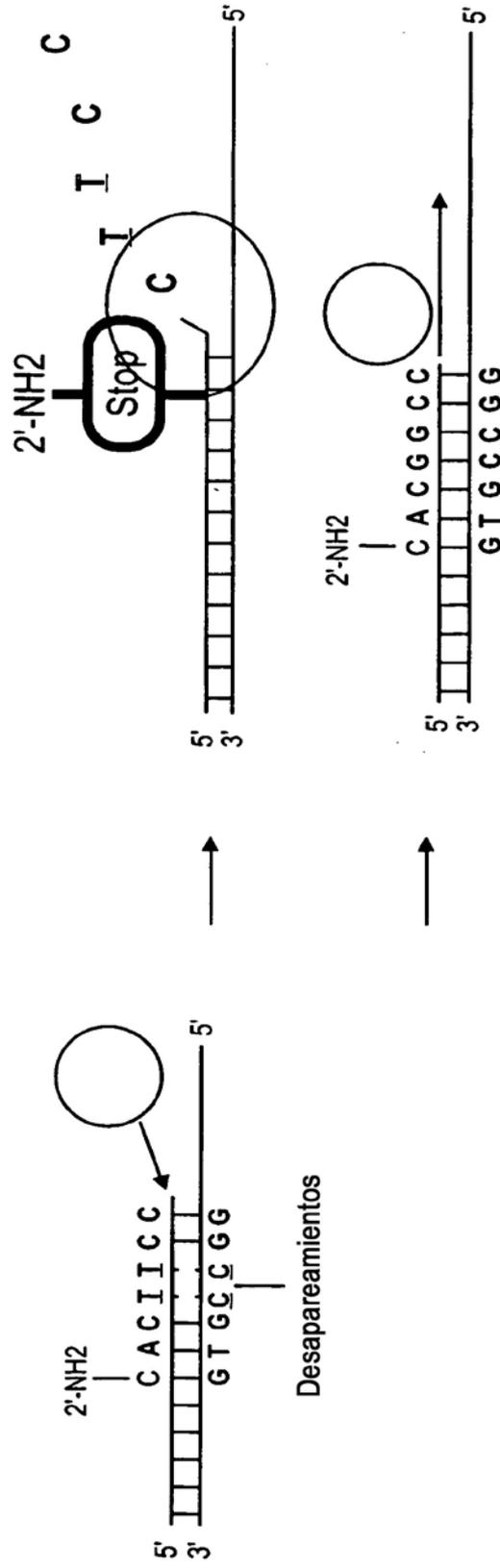


FIG. 2A

Cebadores y moldes en la región GAG del VIH		
Cebador cadena arriba		Cebadores de RT
AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGEAAA	(-1)	GGTACTAGTAGTTCCCTGCTATGTCACTTEC
	(-6)	GGTACTAGTAGTTCCCTGCTATGTCACTTCC
	(-6)	GGTACTAGTAGTTCCCTGCTATGTCACTTPQ
Transcritos	•••	•••
Complementario	•••	•••
No compl.	•• <u>A</u> ••••• <u>G</u> ••••• <u>T</u> •••••	•••••••••••••••••••••• <u>CC</u> ••

Clave: los desapareamientos se muestran en **negrita/subrayados**: E = 2-amino (ribo) C; P = etil-dC; Q = t-butil bencil-dC

FIG. 2B

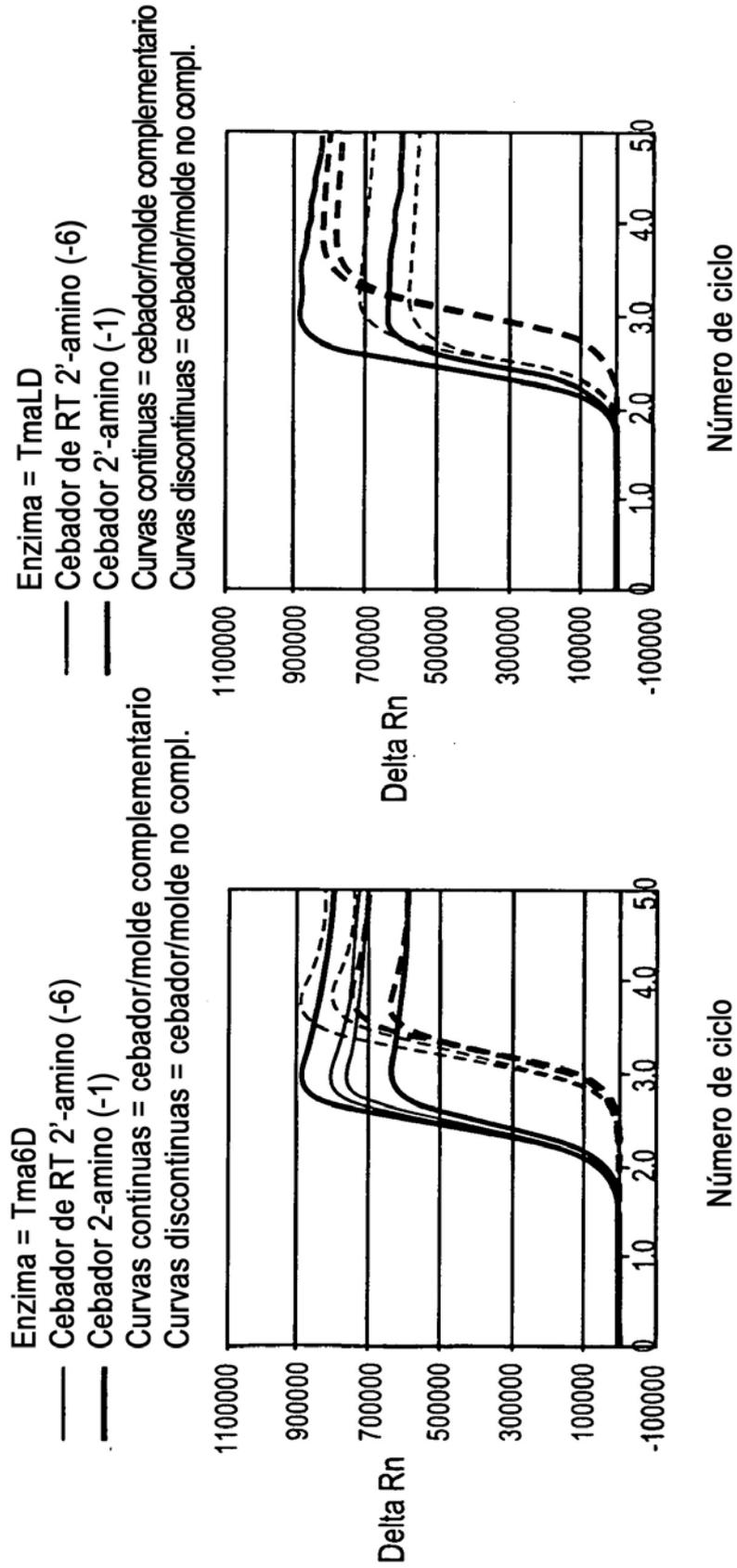


FIG. 2C

Enzimas = Tma6D / Tma1D

- 1 = cebador 2'-amino complementario (-1)
- 2 = cebador 2'-amino no compl. (-6)
- 3 = cebador de RT 2'-amino compl. (-6)
- 4 = cebador de RT 2'-amino no compl. (-6)

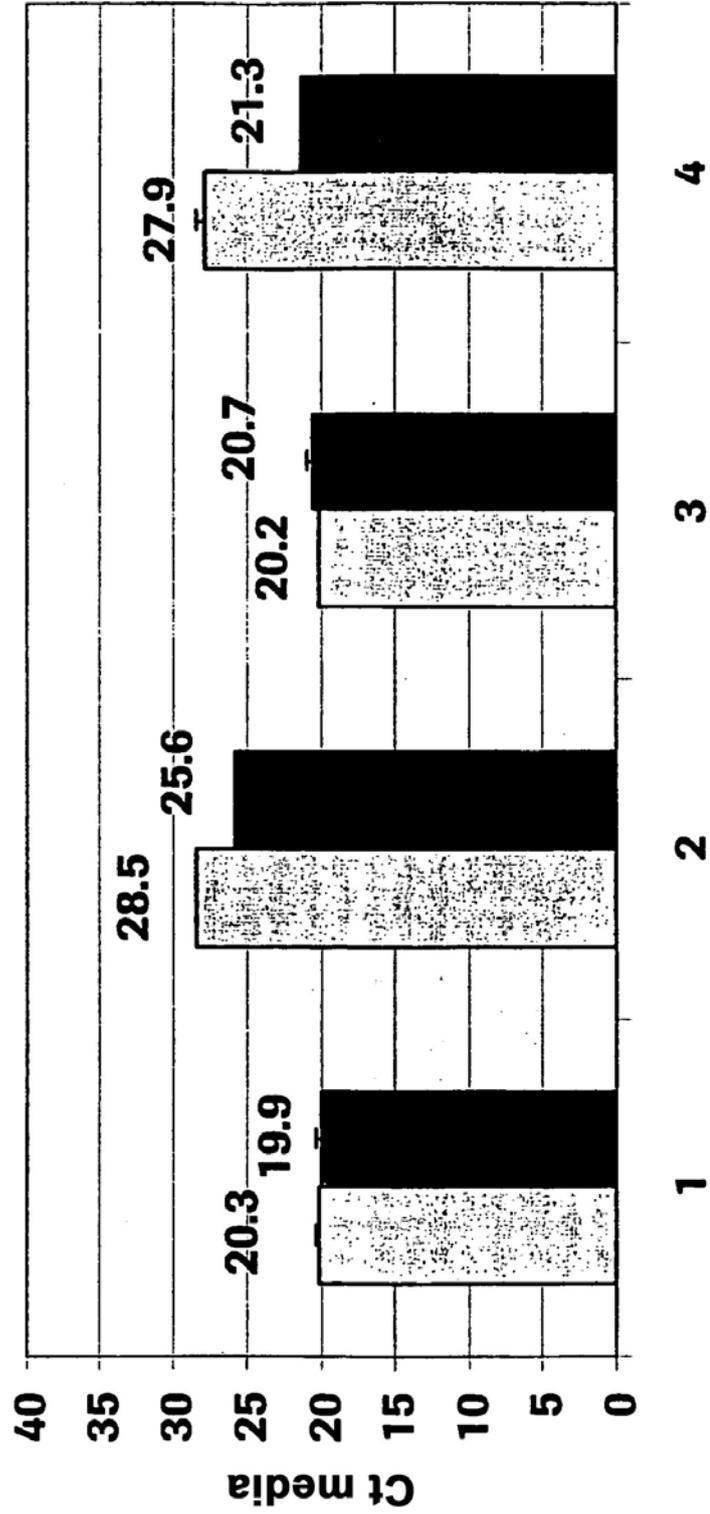


FIG. 3

**Cebador de RT 2'-amino bencilado (-6)
Complementario y no complementario**

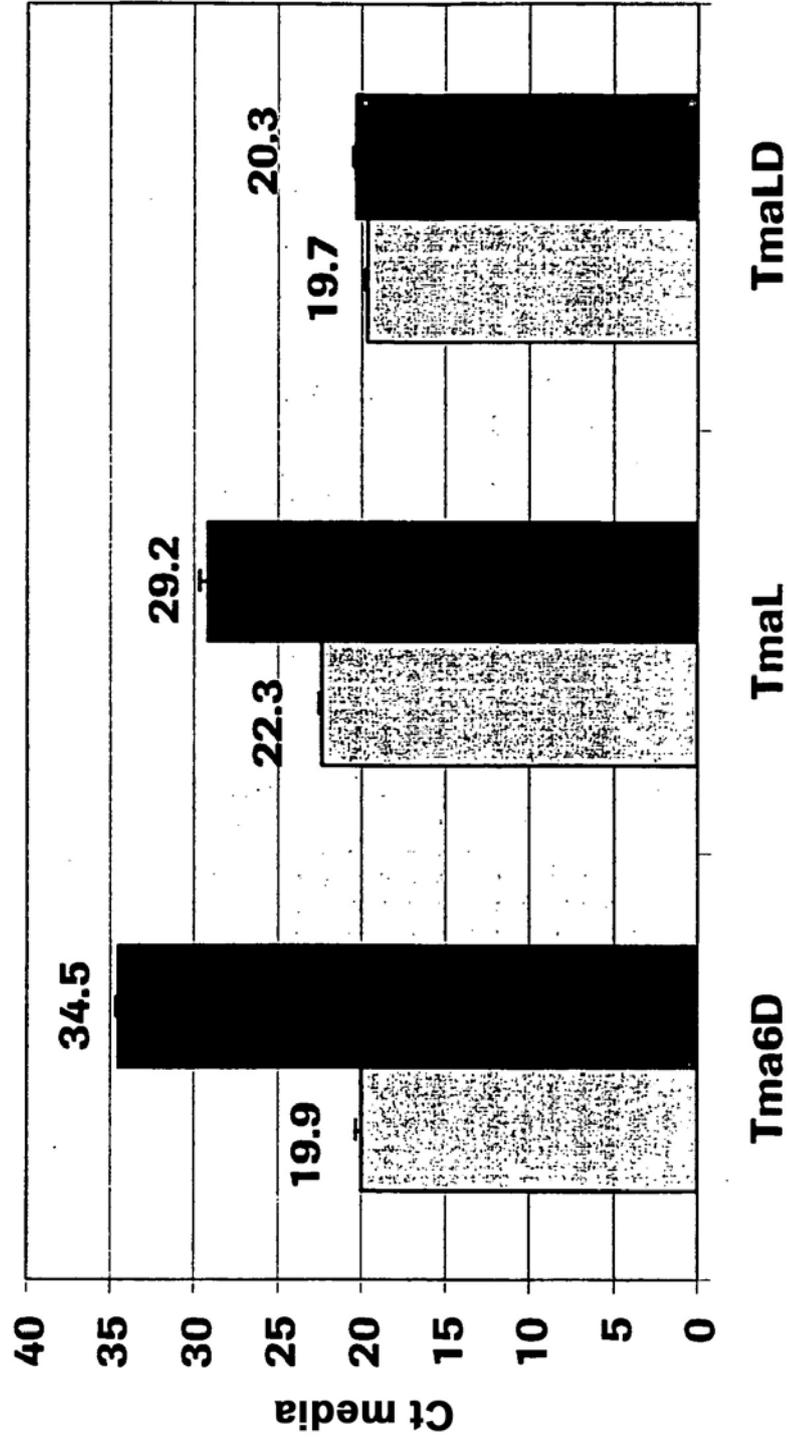


FIG. 4A

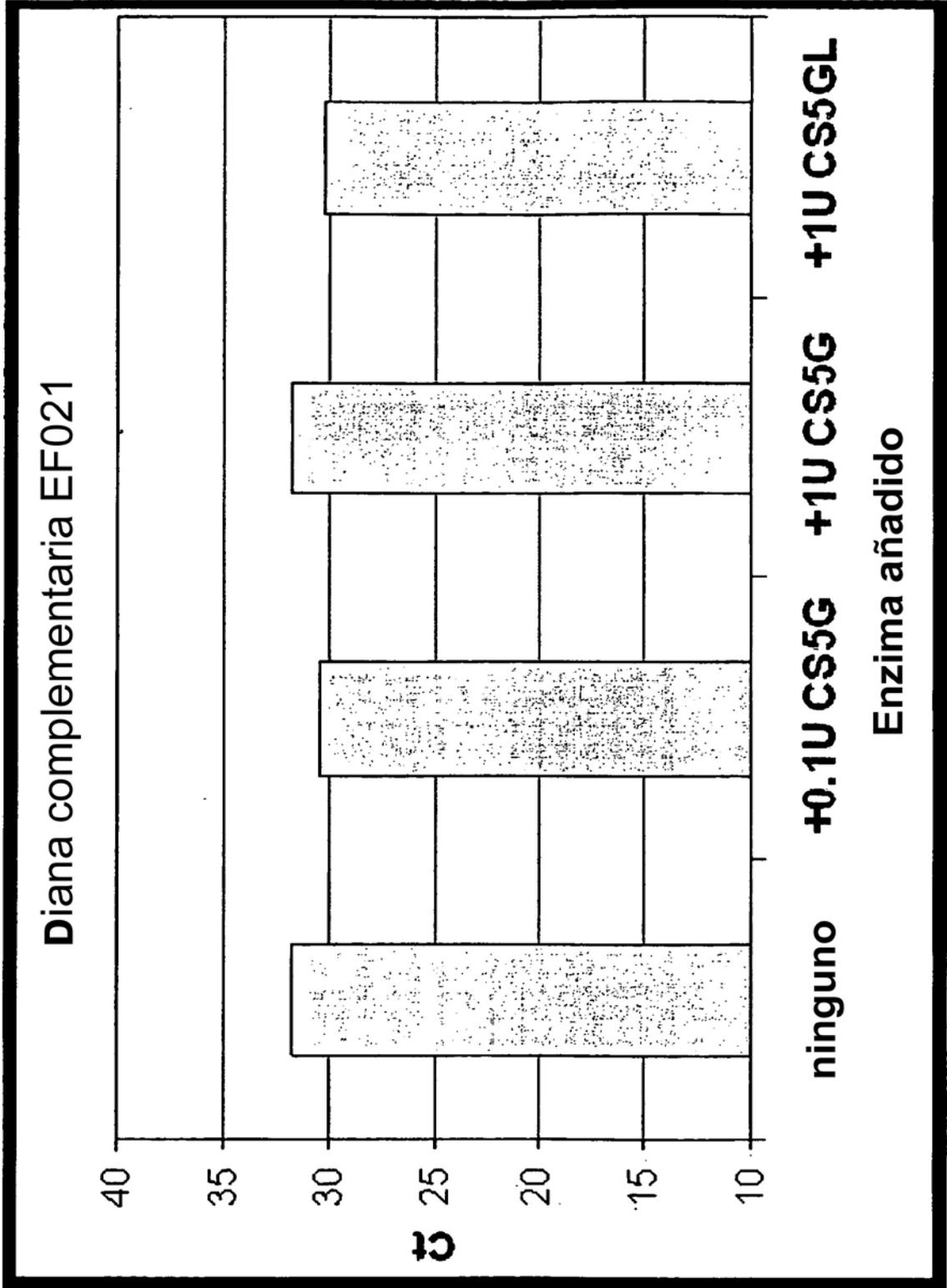


FIG. 4B

