

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 023**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09008229 .8**  
96 Fecha de presentación: **24.06.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2138590**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Método mejorado para la prevención de la contaminación cruzada en tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:  
**26.06.2008 US 76111 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.08.2012**

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

72 Inventor/es:  
**Bohenzky, Roy;**  
**Gupta, Amar;**  
**Montiel, Janine y**  
**Will, Stephen Gordon**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 386 023 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

Método mejorado para la prevención de la contaminación cruzada en tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos

## SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de forma general a métodos de amplificación de ácidos nucleicos y de forma más específica, al control de la contaminación cruzada durante la amplificación de ácidos nucleicos.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación específica de una cantidad tan pequeña como una única copia de una secuencia de ácido nucleico diana. La alta sensibilidad y especificidad de la PCR han demostrado ser muy valiosas en el sector del diagnóstico, del análisis forense y en otras aplicaciones en las que debe detectarse una pequeña cantidad de un ácido nucleico diana. Desafortunadamente, la misma elevada sensibilidad de los ensayos de PCR los hace vulnerables a la contaminación y a resultados positivos falsos. En el sector forense y en el cribado de enfermedades (como por ejemplo la determinación de VIH), los resultados positivos falsos pueden tener consecuencias devastadoras.

El origen más frecuente de resultados positivos falsos es la denominada "contaminación cruzada", en la que un producto de PCR (amplión) de un ensayo anterior contamina los ensayos de PCR siguientes. El contaminante puede ser transmitido por un técnico, un instrumento o incluso por aerosoles. En una muestra "negativa", en la que el ácido nucleico diana está ausente, el contaminante genera un resultado positivo falso. En una muestra "positiva", en la que el ácido nucleico diana está presente, el contaminante es amplificado conjuntamente con la diana verdadera. Dicha amplificación conjunta puede distorsionar el resultado de un ensayo cuantitativo, en el que debe determinarse la cantidad exacta de la diana verdadera.

Una forma popular y efectiva de evitar la contaminación cruzada supone la utilización de uracilo-ADN glicosilasas, específicamente UNG (EC 3.2.2.3). Estas enzimas reconocen los uracilos presentes en el ADN de cadena única o doble y escinden el enlace N-glicosídico entre la base uracilo y la desoxirribosa, dejando un sitio sin base (abásico). Ver, por ejemplo, la Patente nº 6.713.294. Además, las bases uracilo se escinden específicamente por uracilo-ADN glicosilasas generando sitios apirimidínicos susceptibles de la piperidina en la generación de fragmentos de ADN escindidos (ver, por ejemplo, WO 02/090536 y WO 97/12061). Las uracilo-ADN glicosilasas, abreviadas como "UDG" o "UNG" incluyen la UNG1 mitocondrial, la UNG2 nuclear, la SMUG1 (uracilo-ADN glicosilasa selectiva de cadena única), TDG (desajuste de timina ADN glicosilasa), MBD4 (uracilo-ADN glicosilasa con un dominio de unión de metilo) y otras enzimas eucariotas y procariotas (ver Krokan H.E. y otros "Uracil in DNA - occurrence, consequences and repair" ("Uracilo en el ADN - presencia, consecuencias y reparación"), *Oncogene* (2002) 21:8935-9232).

Las uracilo-ADN glicosilasas son enzimas de reparación del ADN que evitan, entre otras cosas, las mutaciones de transición de G a A provocadas por la desaminación de la citosina en uracilo. Si la citosina (C) es desaminada en uracilo (U) y el ADN se somete a replicación, se incorpora una A opuesta al U, mientras que previamente había una G opuesta a la C. Si la base uracilo es eliminada por la glicosilasa antes de la replicación, el sitio abásico es reparado mediante una vía de reparación del ADN con parche corto o largo, que incluye las actividades endonucleasa y ADN polimerasa. Además de la reparación de los daños producidos en el ADN, la actividad ADN glicosilasa juega un papel en las mutaciones somáticas, incluyendo el cambio de clase de inmunoglobulinas y la hipermutación somática durante la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Ver Bransteitter R. y otros "First AID (Activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies" ("En primer lugar se necesita la AID (citidin desaminasa inducida por activación) para producir anticuerpos de alta afinidad con cambio de isotipo"), *J. Bio. Chem.* (2007) 281:16833-16836.

La preparación de uracilo-ADN-glicosilasa (UNG) optimizada para el control de la contaminación cruzada en las reacciones de amplificación se ha dado a conocer, por ejemplo, en la Patente U.S. nº 6.187.575. También se ha descrito la utilización de UNG para evitar la contaminación cruzada, ver Longo y otros "Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction" ("Utilización de la uracilo ADN glicosilasa para controlar la contaminación cruzada en la reacción en cadena de la polimerasa") (1990) *Gene*, 93:125-128. El método del estado de la técnica para controlar o disminuir el riesgo de contaminación cruzada utilizando la UNG se describe en las patentes U.S. nº 6.287.823, 6.518.026 y la publicación U.S. nº 2003/0077637, y en combinación con la producción de moléculas de ácido nucleico sintetizadas *in Vitro* descrita en EP 1 041 159 y EP 1 038 974.

En general, el método incluye dos etapas. En primer lugar, los ensayos de PCR deben incluir dUTP, de manera que los amplicones, que son potenciales contaminantes en la contaminación cruzada, contienen uracilo. El método supone sustituir por dUTP algunos o todos los dTTP de la reacción de amplificación. Alternativamente (o adicionalmente), puede incorporarse uno o más uracilos en los cebadores de amplificación. Debe tenerse en cuenta, si embargo, que si un uracilo del cebador está demasiado cerca del extremo 5', el método es menos

eficiente para evitar su amplificación subsiguiente. La utilización de dUTP no interfiere con los ensayos de PCR. Tras la generación de un amplicón que contiene uracilo, éste puede detectarse y analizarse mediante métodos estándar a pesar de la presencia de uracilo en lugar de timina.

- 5 A continuación, se añade uracilo-N-ADN glicosilasa a la PCR subsiguiente. Convenientemente, UNG es activo en una mezcla de reacción estándar que contiene todos los componentes de la PCR. Esto permite la adición de UNG a reacciones de PCR ya montadas o incluso en la mezcla maestra de PCR. Previamente al inicio del ciclado térmico, la mezcla de reacción se incubaba a una temperatura óptima para la actividad UNG en el contexto de la mezcla maestra de PCR (aproximadamente 50°C) o dentro de un intervalo de temperaturas en el que la UNG es activa. Si existen contaminantes que contienen uracilo de una reacción anterior, la UNG escindiría el uracilo, dejando un sitio abásico. Se sabe que el ADN abásico es lábil a temperaturas elevadas bajo condiciones de pH elevado. Cuando se inicia el ciclado térmico, dicho ADN es degradado. La temperatura elevada también inhibe el enzima UNG, permitiendo la generación de nuevos amplicones de ADN que contienen uracilo.
- 10
- 15 Tras el tratamiento con la UNG, el ADN abásico deber ser escindido eficientemente en los sitios abásicos. Si no se escinde, el ADN abásico actúa como molde para la polimerasa en la amplificación subsiguiente. Por ejemplo, se sabe que la Taq ADN polimerasa omite los sitios abásicos incorporando una adenosina en el sitio opuesto a la base ausente. Una sola omisión por parte de la polimerasa genera un molde perfecto para la amplificación subsiguiente (ver Sikorsky, J.A. y otros, "DNA damage reduces Taq polymerase fidelity and PCR amplification efficiency" ("Los desperfectos en el ADN reducen la fidelidad y eficiencia en la amplificación de la PCR de la polimerasa Taq"), Biochem. Biophys. Res. Commun. (2007) 355:431-437 o Kobayashi, A. y otros "Novel PCR-mediated mutagenesis employing DNA containing a natural abasic site as a template and translesional Taq DNA polymerase" ("Mutagénesis mediante PCR novedosa utilizando como molde ADN que contiene sitios naturales abásicos y Taq ADN polimerasa trans-lesional"), J. Biotech. (2005) 116:227-232). Por lo tanto, la capacidad de escindir eficientemente el ADN en los sitios abásicos es esencial para el éxito global del método basado en UNG para evitar la contaminación cruzada.
- 20
- 25

#### RESUMEN DE LA INVENCION

- La presente invención incluye un método de control mejorado de la contaminación cruzada utilizando ADN glicosilasa. Los inventores han determinado que el factor limitante en la eliminación exitosa del contaminante de la contaminación cruzada es la degradación eficiente del ADN abásico. La opinión aceptada es que la etapa limitante es la digestión enzimática para generar ADN abásico. Se consideraba que la etapa subsiguiente de degradación no enzimática del ADN abásico era sencilla, eficiente y sin necesidad de mejoras. Los esfuerzos previos para mejorar los métodos de control de la contaminación se han centrado en la adición de más enzima glicosilasa para incrementar los tiempos de incubación. Los inventores han descubierto que al contrario de la opinión aceptada, la etapa enzimática es extremadamente eficiente. Al mismo tiempo, la etapa de degradación no enzimática es ineficiente y, por lo tanto, el origen probable de la persistencia de contaminación. Si un contaminante se escapa de la degradación durante los ciclos iniciales de la PCR, este es copiado por la polimerasa y ya no puede ser eliminado.
- 30
- 35
- 40 Los inventores han descubierto que el control de la contaminación puede mejorarse de forma dramática añadiendo agentes que degradan o facilitan la degradación del ADN abásico en la muestra. De dichos agentes los más útiles son aquellos compatibles con la amplificación subsiguiente como una poliamina. Por consiguiente, la muestra se pone en contacto con poliaminas. En algunas realizaciones, la poliamina es espermidina, espermina o una amina intercaladora. A temperaturas elevadas y pH alto, las poliaminas mejoran de forma significativa la degradación del ADN abásico sin inhibir la PCR. Además, la muestra se pone en contacto con un enzima, que cataliza la escisión del esqueleto del ADN abásico. Se dan a conocer las composiciones y métodos que utilizan estos agentes y similares.
- 45

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 50 Las Figuras 1A y B muestran los cromatogramas de HPLC de los productos de degradación de un oligonucleótido que tiene sitios abásicos, en la ausencia o presencia de concentraciones crecientes de espermina. La Figura 1A muestra la degradación a 5 0°C. La Figura 1B muestra la degradación a 50° C se guía de un pico térmico de 2 minutos a 95°C.
- 55 Las Figuras 2A y B muestran los resultados de la amplificación de diversas cantidades de dianas de ADN y ARN en ausencia o presencia de espermina. La Figura 2A muestra la amplificación de diversas cantidades de copias de entrada de ADN de VHC con o sin 100 µM de espermina. La Figura 2B muestra la amplificación de diversas cantidades de copias de entrada de ARN de VHC en presencia de 50 µM de espermina.
- 60 La Figura 3 muestra los resultados de la amplificación de una secuencia diana utilizando solamente dUTP o una combinación de dUTP y dTTP.
- La Figura 4 muestra los resultados de la amplificación tras pretratamiento con cantidades crecientes de UNG.
- 65 La Figura 5 muestra los resultados de la amplificación de secuencias que contienen dU y dU/dT con o sin pretratamiento con UNG.

La Figura 6 muestra los resultados de la amplificación tras pretratamiento con UNG en presencia de espermina.

La Figura 7 muestra los resultados de la amplificación tras pretratamiento con UNG a varias temperaturas.

## 5 DEFINICIONES

Para facilitar la comprensión de la presente invención, pueden ser útiles las siguientes definiciones.

10 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “poliamina” significa un compuesto orgánico que posee más de un grupo amino o una sal de dicho compuesto. Las poliaminas incluyen, si n ca rácter limitante, diaminas, triaminas, tetraminas y específicamente, espermidina, espermina, putrescina, guanidina y dietilén triamina.

15 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “amplicón” significa una población de moléculas de ADN que ha sido producida mediante la amplificación de un molde mediante, por ejemplo, PCR.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “secuencia diana” significa una secuencia de ácido nucleico de especial interés, posiblemente presente en una muestra.

20 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “ADN abásico” o “ADN con un sitio abásico” se refiere a una moléculas de ADN, ya sea de cadena única o doble, que contiene al menos un nucleótido abásico, en ocasiones denominado “sitio abásico”. Un “nucleótido abásico” es un nucleótido que carece de base en la posición 1' de la desoxirribosa.

25 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “endonucleasa AP” o “liasa AP” significa un enzima capaz de romper el esqueleto fosfodiéster de un ácido nucleico. El término incluye enzimas capaces de romper el esqueleto tanto en dirección 5' como 3' del sitio abásico.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

30 La presente invención se refiere a un método mejorado para controlar o disminuir la contaminación cruzada de las reacciones de amplificación de ácido nucleico utilizando un enzima que posee actividad ADN glicosilasa y un reactivo que facilita la degradación del ADN abásico como una poliamina. A modo de ejemplo, la presente invención utiliza ADN glicosilasa o uracilo ADN glicosilasa. De forma general, el método se inicia con la generación de amplicones que contienen una base no habitual. A modo de ejemplo, la presente invención utiliza uracilo. Ello puede conseguirse realizando una amplificación de ácidos nucleicos en presencia de dUTP, incorporando desoxiuridina en los cebadores de amplificación o desaminando las citosinas presentes en el ADN. Después de que la primera reacción de amplificación genere amplicones con uracilo, cualquier reacción de amplificación subsiguiente se trata previamente con un enzima que posee actividad uracilo-ADN glicosilasa, por ejemplo, el enzima UNG. Si se halla presente un amplicón contaminante de una amplificación anterior, UNG escindirá el uracilo de dicho amplicón y generará un sitio abásico.

45 Aunque el uracilo y UNG son los más habitualmente utilizados para controlar la contaminación, debe tenerse en cuenta que existen sistemas enzima/substrato alternativos que actúan del mismo modo. Es conocido en la técnica que enzimas de reparación del ADN específico reconocen y escinden del ADN diversas bases no naturales, dando lugar a un sitio abásico. Puede utilizarse una combinación de dicha base no natural y enzima específico para controlar la contaminación cruzada siempre y cuando la polimerasa sea capaz de incorporar la base no natural dentro del amplicón potencialmente contaminante o, alternativamente, que el amplicón potencialmente contaminante pueda ser tratado de modo que se de lugar a la presencia de la base no natural. Como ejemplos de dichos pares enzima/substrato se incluyen MutY o MutM y 8-oxoguanosina, hOGG1 y 8-oxoguanosina, MBD4 humana y uridina, Endo VIII de E. coli y glicol timina u otras pirimidinas oxidadas y una serie de otros pares similares descritos, por ejemplo, en Hitomi y otros (2007) DNA Repair 6:410-428.

55 Según los métodos tradicionales, tras la incubación con UNG, la etapa siguiente es someter la mezcla de reacción a ciclos térmicos. Las reacciones de amplificación, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la reacción en cadena de la ligasa (LCR), incluyen un calentamiento inicial o “etapa de desnaturalización”. Se consideraba que esta etapa de calentamiento inicial era suficiente para conseguir la desnaturalización del ADN abásico, dado que se sabe que éste es lábil a temperaturas elevadas bajo condiciones de pH alto. Si el método no conseguía la esterilización, los profesionales sospecharían el fracaso de la etapa enzimática con UNG. Es conocido, de modo general, que los enzimas son sensibles a las condiciones de reacción. Con una mínima desviación de las condiciones óptimas, un enzima puede perder gran parte o toda su actividad. Por lo tanto los enzimas son habitualmente los primeros sospechosos ante el fracaso de un método. Por otro lado, se considera que las reacciones químicas no enzimáticas son más robustas. Por ejemplo Kleiboecker (“Quantitative detection of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA de gradation and RNA amplification in reverse transcription PCR” (“Detección cuantitativa del efecto de la uracilo-AND glicosilasa en la degradación de amplicones de ADN y de ARN en la PCR de transcripción inversa”), Virology Journal (2005) 2: 29)) informa de los pobres resultados en la eliminación de diversos moldes. Para mejorar la eficiencia, Kleiboecker expone el incremento de la cantidad de UNG,

del tiempo de incubación y el incremento de la temperatura de incubación. Se conoce, sin embargo, que la presencia de cantidades excesivas de UNG es perjudicial para la PCR. Aunque la UNG es eventualmente inactivada por el calor, retiene una actividad sustancial durante un tiempo prolongado durante los ciclos térmicos. Como la temperatura se acerca periódicamente a la óptima de 50°C (durante la etapa de hibridación de la PCR), la UNG se vuelve parcialmente activa e inicia la digestión de los nuevos amplicones generados que contienen uracilo. Por lo tanto, no deben continuarse añadiendo cantidades cada vez mayores de UNG.

De forma sorprendente, los inventores han descubierto que la UNG no es la causa de los fracasos del método de esterilización. Contrariamente a lo esperado, el factor limitante en el método de esterilización no es la etapa enzimática, si no la etapa subsiguiente de escisión de la cadena. Habiendo analizado los productos intermedios del método de la UNG mediante HPLC, los inventores han determinado que la UNG convierte más del 95% de los uracilos del ADN en sitios abásicos. Sin embargo solamente un 6% del ADN abásico resultante es escindido a 50°C y solamente aproximadamente el 10% es escindido a 95°C. Por lo tanto, los inventores han desarrollado una mejora útil del método de esterilización con UNG, que supone la adición de agentes que facilitan la degradación del ADN abásico. Es una mejora especialmente útil aquella que incluye tipos de dichos agentes que no interfieren con las reacciones de amplificación subsiguientes.

Según la presente invención, dichos agentes facilitadores de la degradación del ADN abásico son poliaminas. De modo general, las poliaminas son moléculas de hidrocarburo lineales que incluyen, como mínimo, dos grupos amino, estando situados dichos grupos amino a ambos extremos. Algunas poliaminas lineales están sustituidas por grupos no lineales o cíclicos. Además de los grupos amino terminales, algunas poliaminas poseen en la cadena uno o más grupos amino internos. En algunas realizaciones, la poliamina posee una estructura en la que los grupos amino adyacentes están separados entre sí por tres carbonos. El análisis comparativo de un gran número de poliaminas ha mostrado que esta estructura permite una escisión óptima de los sitios abásicos, ver Steullet y otros "Cleavage of abasic sites in DNA by intercalator amines," ("Escisión de sitios abásicos del ADN mediante aminas intercaladoras") *Bioorg. Medic. Chem.* 1999 (7), 2531-2540. La escisión de sitios abásicos en el ADN mediante la utilización de poliaminas también ha sido descrita por McHugh P.J. y Knowland J. "Novel reagents for chemical cleavage at abasic sites and UV photoproducts in DNA" ("Reactivos novedosos para la escisión química de sitios abásicos y fotoproductos UV del ADN"), (1995) *Nucleic Acid Res.*, Oxford University Press, Surrey/GB, 23/10: 1664-1670 y Bailly y otros "The multiple activities of *E. coli* endonuclease IV and the extreme lability of 5'-terminal base-free deoxyribose 5-phosphate" ("Las múltiples actividades de la endonucleasas IV de *E. coli* y la extrema labilidad de la desoxirribosa 5-fosfato sin base en el extremo 5") (1989) *The Biochem. J.*, 259/3: 761-768. Esta norma se cumple independientemente del número total de átomos y del número total de grupos amino de la poliamina. Como ejemplos de poliaminas útiles se incluyen:

Espermidina,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH})(\text{CH}_2)_4(\text{NH}_2)$ ;

Espermina,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH})(\text{CH}_2)_4(\text{NH}_2)$ ;

Trimetilendiamina,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH}_2)$ .

Preferentemente, según la invención, se añaden a la reacción una o más poliaminas, dando lugar a una concentración entre 0,01 mM y 1 mM.

En algunas realizaciones la poliamina es una amina intercaladora. Las poliaminas de este grupo poseen un grupo intercalador, capaz de intercalarse entre los pares de bases o bases de un ácido nucleico. Como ejemplos de grupos intercaladores en una poliamina se incluyen los arenos y los poliarenos, tales como el naftaleno y la antraquinona. En algunas realizaciones, el grupo intercalador también puede estar sustituido con una o más cadenas laterales de poliamina. Las aminas intercaladoras son frecuentemente más eficientes para degradar ácidos nucleicos abásicos que las aminas lineales. Si se describirse a ninguna teoría en particular, pueden ser y su gerirse que este efecto es probablemente debido al intercalado, que lleva la parte activa de la molécula de poliamina a una situación cercana a sitio abásico diana.

Es conocido que las poliaminas mejoran la eficiencia de diversas reacciones enzimáticas que incluyen ácidos nucleicos. Por ejemplo, se ha descubierto que una o más poliaminas (etilendiamina, trimetilendiamina, espermidina y espermina) mejoran en ocasiones la eficiencia de la amplificación mediante PCR utilizando muestras impuras, tales como la sangre o tejidos de plantas o animales (ver los resúmenes en inglés de las publicaciones de solicitud de patente japonesa JP 11113573, JP 2001008680, JP 8009997 y JP 6277061). De forma general, se observó que diversas poliaminas poseían una capacidad muy similar de facilitar las reacciones enzimáticas. La Patente U.S. nº 6.413.747 "Enhancement of nucleic acid amplification by the addition of a polyamine" ("Incremento de la amplificación de ácidos nucleicos mediante la adición de una poliamina") da a conocer la utilización de nueve poliaminas diferentes, todas ellas capaces de incrementar la eficiencia de la PCR. Otro grupo ha observado que las poliaminas incrementan la eficiencia a la vez que disminuyen la especificidad de la PCR utilizando ADN extraído de semillas de cebada congeladas, ver Ahokas H. y M. J. Erkkila "Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine" ("Interferencia de la amplificación mediante PCR por las poliaminas, espermina y espermidina"), (1993) *PCR Methods Appl.*, 3: 65-68. Este grupo observó que el incremento de la concentración de

poliaminas en la reacción de 0,6 mM a 0,8 mM da lugar a cuatro productos adicionales de PCR a partir de la misma combinación molde-cebador. También, se conoce en la técnica que la actividad de la UNG es estimulada en presencia de poliaminas, ver Williams y otros "Amplification of DNA repair enzyme: purification and characterization of uracil-DNA glycosylase" ("Enzima de reparación de ADN de mollicute (micoplasma): purificación y caracterización de la uracilo-ADN glicosilasa"), (1990) J. Bacteriol., 172/6: 2979-2985.

Sin sustentarse en ninguna teoría en particular, puede sugerirse que tomados conjuntamente, los datos existentes muestran que las poliaminas mejoran la amplificación del ADN dañado. Es posible que las poliaminas incrementen la capacidad de las polimerasas de sortear los sitios dañados del ADN, tales como los sitios abásicos. Siguiendo esta lógica, debería esperarse que, del mismo modo, las poliaminas permitieran la amplificación de los contaminantes digeridos con UNG antes de su degradación durante la PCR. Por lo tanto, debería concluirse que las poliaminas contrarrestarían el método basado en UNG para evitar la contaminación cruzada y no deberían utilizarse conjuntamente con este método. Por el contrario, se ha descubierto que de hecho las poliaminas mejoran el control de la contaminación basado en la UNG, incrementando la degradación del ADN a nivel de sus sitios abásicos. Según la presente invención, una solución de muestra que comprende un reactivo facilitador de la degradación del ADN abásico, una poliamina, se incubaba preferentemente a las condiciones adecuadas para provocar la degradación del ADN correspondiente con, al menos, un sitio abásico, más preferentemente a una temperatura entre 30°C y 95°C.

Debe entenderse que el éxito en la eliminación del contaminante cruzado se relaciona con la composición de las bases del amplicón a eliminar. Un bajo contenido en desoxiadenosina de la cadena a copiar conlleva un bajo contenido en desoxiuridina del producto de la amplificación realizada en presencia de dUTP. Por lo tanto, tras el tratamiento con UNG, dicho producto de amplificación poseerá una cantidad inferior de sitios abásicos y sufrirá una rotura menor del esqueleto. Debe entenderse además que si las uridinas se distribuyen de forma asimétrica entre las dos cadenas de un amplicón, la cadena pobre en uridina puede sobrevivir al proceso de esterilización y asegurar la supervivencia de todo el amplicón contaminante. En los ejemplos siguientes, se utilizaron dianas con cantidades y proporciones diferentes de timidinas. Tal como se muestra en la Tabla 1, el contenido en dT (dU) de las cadenas diana oscilaba entre un 15% y un 35%. Se describe la secuencia diana de la Diana 2 para los ejemplos descritos, a continuación. Esta diana posee el número absoluto más bajo de timidinas (66) en una forma de doble cadena, así como el contenido absoluto y relativo más bajos en una cadena única (la cadena directa).

<i>Contenido en dT (dU) de diversas secuencias diana</i>						
Diana	Diana 1	Diana 2	Diana 3	Diana 4	Diana 5	Control interno
Tamaño, bp	154	141	157	132	241	124
dTs totales	79 (25%)	66 (23%)	79 (25%)	72 (27%)	95 (20%)	61 (25%)
dTs de la cadena directa	32 (21%)	22 (%)	47 (30%)	46 (35%)	511 (21%)	32 (26%)
dTs de la cadena inversa	47 (31%)	44 (31%)	32 (20%)	26 (20%)	44 (18%)	29 (23%)

Mientras que la sustitución de todas las timidinas por uracilos garantiza la máxima actividad de UNG sobre un amplicón, puede ser deseable generar amplicones con una mezcla de timidinas y uracilos. Ello es debido a que muchas de las ADN polimerasas conocidas en la técnica poseen una baja preferencia por el dUTP como sustrato. Tal como se muestra en los ejemplos siguientes, la amplificación en presencia solamente de dUTP es, en general, menos eficiente que la amplificación en presencia de dUTP u dTTP. Se entiende que la diferencia en la eficiencia puede variar entre secuencias diana diferentes y según las cantidades de dTTP y dUTP en la mezcla de reacción. Por lo tanto, para algunas secuencias diana, puede recomendarse la adición de diversas cantidades de dTTP. En algunas realizaciones, la relación molar dTTP:dUTP en la mezcla de reacción es 1:10. En algunas realizaciones, la concentración de dUTP es superior a la de dATP, dCTP, y dGTP. En un ejemplo, las concentraciones de nucleótidos en la reacción de amplificación pueden ser de 0,3 mM de cada dATP, dCTP, y dGTP, 0,5 mM para dUTP y 0,05 mM para dTTP.

En otros ejemplos, los agentes que facilitan la degradación del ADN abásico son enzimas, tales como la exonucleasas IV, la exonucleasa III o la AP liasa.

Kits

La presente invención también da a conocer kits útiles para utilizar el método de la invención. Los kits comprenden uno o más de los reactivos descritos en la presente invención, un reactivo que posee actividad de ADN glicosilasa y un reactivo capaz de degradar el ADN abásico como un a poliamina. Opcionalmente, los kits pueden incluir instrucciones en papel o en formato electrónico.

Por lo tanto, los kits incluyen una poliamina adecuada para facilitar la degradación no enzimática del ADN abásico. En otros ejemplos, los kits incluyen, además, un enzima capaz de degradar el ADN abásico. Como otros reactivos del kit se incluyen reactivos útiles para la amplificación de los ácidos nucleicos. Estos reactivos incluyen, sin carácter limitante, uno o más oligonucleótidos cebadores, polimerasa de ácidos nucleicos, tampones, sales y nucleósidos

trifosfato y un enzima con actividad ADN glicosilasa, tal como la actividad uracilo-N-glicosilasa. Los nucleósidos trifosfato incluyen dATP, dCTP, dGTP y uno más entre dUTP y dTTP. En lugar de dUTP, puede añadirse otro nucleósido trifosfato no convencional adecuado. Si se utiliza otro nucleósido trifosfato no convencional, pueden ser reactivos adicionales del kit aquellos reactivos útiles para la detección de los ácidos nucleicos amplificados. Estos reactivos incluyen, sin carácter limitante, una o más sondas marcadas, como por ejemplo sondas marcadas radiactivamente o mediante fluorescencia, sondas TaqMan™ y otras sondas de PCR en tiempo real.

#### Mezclas de reacción

La presente invención también da a conocer mezclas de reacción. Una mezcla de reacción típica comprende los componentes utilizados para la amplificación de ácidos nucleicos y uno o más reactivos para facilitar la generación y degradación de ADN abásico. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contendrán los reactivos utilizados para la detección de ácidos nucleicos. Las mezclas de reacción contienen además reactivos utilizados para evitar la contaminación cruzada. Una mezcla de reacción ejemplar de la presente invención comprende uno o más oligonucleótidos cebadores, una polimerasa de ácido nucleico, tampones, sales, nucleósidos trifosfato y un enzima con actividad ADN glicosilasa, tal como por ejemplo una actividad uracilo-N-glicosilasa, para generar ADN con al menos un sitio abásico. Las mezclas de reacción comprenden además una poliamina para facilitar la degradación del ADN abásico. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contendrán además un enzima capaz de escindir el ADN abásico. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contendrán además una o más sondas marcadas.

Debe tenerse en cuenta, que el alcance de la presente invención incluye cualquier método de amplificación que sea susceptible a presentar contaminación cruzada. Los métodos de amplificación incluyen, sin carácter limitante, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR en tiempo real, la PCR punto final, la PCR asimétrica y la reacción en cadena de la ligado (LCR).

#### Ejemplos

Los ejemplos siguientes ejemplifican el método de la presente invención.

##### Ejemplo 1

Efecto de la espermina en la degradación de un oligonucleótido que posee sitios abásicos

El oligonucleótido de ADN con desoxiuracilo de identificador de secuencia nº 1:

5'-TTTGCATGGCTGCUTGATGTCCCCCACT-3'

se incubó en una solución preparada combinando una alícuota de 10 µl de una solución 100 µM con 10 µl de una solución maestra falsa de PCR-RT. La solución maestra falsa contenía tricina 50-mM (pH 8,3), acetato potásico 90 mM, dATP, dCTP y dGTP de 200 µM cada uno de ellos, dUTP 400 µM, acetato de manganeso 4 mM, DMSO 5%, y glicerol 5%. Adicionalmente, la mezcla de reacción contenía 2,5 µl de agua o de solución de espermina a la concentración adecuada, y 2 µl de 4 unidades/µl de UNG. Las incubaciones fueron durante 30 minutos a 50°C, con o sin un pico de calor adicional a 95°C durante dos minutos. Las reacciones se analizaron mediante HPLC-MS utilizando el sistema de detección Agilent 1100 MSD con una fuente de ionización por electrospray. Los datos de la espectrometría de masas (MS) (no mostrados) mostraron claramente que bajo todas las condiciones, la eliminación del uracilo fue completa (dentro de los límites del método de detección). Los resultados de la HPLC se muestran en las Figuras 1A y 1B. La Figura 1A muestra la degradación a 50°C en presencia de 100 µM, 1 mM y 10 mM de espermina. A 10 µM, todavía es detectable el oligonucleótido completo. La Figura 1B muestra la degradación tras una exposición de 2 minutos a 95°C, también en presencia de 100 µM, 1 mM y 10 mM de espermina. A 95°C, incluso a la concentración de 100 µM, el oligonucleótido completo ya no es detectable. Los resultados muestran que con cantidades crecientes de espermina, el oligonucleótido completo se degrada más eficientemente en fragmentos. A temperaturas más altas, el efecto se consigue con una concentración más baja de espermina. Sin embargo, tal como muestran los resultados, las temperaturas más altas son insuficientes por sí mismas para provocar la degradación del ADN abásico.

##### Ejemplo 2

*Amplificación de AND y ARN en presencia de espermina*

Para el ADN, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un molde de ADN de 241 bp (Diana 5, 20% dT en ADN de doble cadena). La mezcla de reacción contenía 40 unidades de polimerasa ADN ZO5, Tricina 50 mM (pH 8,3), acetato potásico 90 mM, dATP, dCTP y dGTP de 200 µM de cada uno de ellos, dUTP 400 µM, cebadores cadena arriba y cadena abajo de 0,1 µM de cada uno, acetato de manganeso 4 mM, DMSO 5%, y glicerol 5%, tinte de intercalado SYTO-16 2 µM y, opcionalmente, 100 µM de espermina. La amplificación se realizó en un

instrumento Roche LightCycler 480 utilizando el perfil de temperatura siguiente 50°C durante 5 minutos (etapa UNG), dos ciclos de 94°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 59°C durante 40 segundos (hibridación y extensión), 48 ciclos de 91°C (desnaturalización) y 59°C durante 40 segundos (hibridación y extensión). Se recogieron los datos de fluorescencia durante las etapas de hibridación/extensión de los últimos 48 ciclos utilizando una combinación de filtros de 483/533 nm para la excitación y emisión respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 2A, y en la Tabla 2A. Los grupos de líneas continuas representan las reacciones de amplificación sin espermina, realizadas por triplicado. Los grupos de líneas de puntos representan las reacciones de amplificación en presencia de espermina realizadas por triplicado. Los resultados muestran que la amplificación no es inhibida significativamente por la espermina.

Tabla 2A

<i>Amplificación por PCR de ADN (valores Ct) en ausencia o presencia de espermina</i>			
Nº de copias de molde	Sin espermina	Espermina 100 µM	Diferencia en Ct
10 <sup>0</sup>	18,8	19,0	+0,2
10 <sup>4</sup>	25,7	25,9	+0,2
10	36,6	36,1	-0,5

Para el ARN, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar 0-10<sup>6</sup> copias de un ARN equivalente a la Diana 5. La mezcla de reacción y el perfil de temperatura fueron los mismos que en el caso del molde de ADN, excepto en que se añadió transcriptasa inversa y que tras la etapa inicial UNG, la reacción se incubó a 66°C durante 30 minutos (transcripción inversa). Los resultados se muestran en la Figura 2B y la Tabla 2B. Como en la Figura 2A los grupos de líneas continuas representan las reacciones de amplificación sin espermina, realizadas por triplicado. Los grupos de líneas de puntos representan las reacciones de amplificación en presencia de espermina realizadas por triplicado. Los resultados muestran que la amplificación no es inhibida significativamente por la espermina.

Tabla 2B

<i>Amplificación (valores medios de Ct) de 10, 10<sup>4</sup> y 10<sup>6</sup> copias de ARN en ausencia o presencia de espermina</i>			
Nº de copias	Sin espermina	Espermina 100 µM	Diferencia en Ct
10	34,4	34,0	-0,3
10 <sup>4</sup>	23,8	23,5	-0,3
10 <sup>6</sup>	16,8	16,6	-0,2

### Ejemplo 3

#### *Eficiencia de la amplificación en presencia de dUTP solamente o una combinación de dUTP y dTTP*

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar 100.000 copias de un molde de ARN de 141 nucleótidos (Diana 2 de la Tabla 1). Esta diana posee un contenido muy bajo en dU. El ADN de doble cadena correspondiente posee un 23% de dT (Tabla 1). Cuando se realiza la amplificación en presencia de dTTP y dUTP, el contenido en dU del amplicón puede ser incluso inferior. La mezcla de reacción incluía betaína 0,5 M, pH 6,3; acetato potásico 68 mM, pH 7,0; glicerol 2,8%, acetato de manganeso 3 mM, pH 6,1; azida sódica 0,07%; DMSO 5%, tricina 50 mM, pH 8,3; dATP, dCTP y dGTP 0,3 mM de cada uno de ellos; dUTP 0,5 mM; y donde se indique, dTTP 0,05 mM; 40 unidades de polimerasa ADN ZO5; aptámero 0,2 µM, cebador directo e inverso 0,2 µM de cada uno, 0,1µM de sonda. El perfil de temperatura fue: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 minutos (transcripción inversa), cinco ciclos de 95°C durante 15 segundos y 59°C durante 21 segundos, 52 ciclos adicionales de 91°C durante 15 segundos y 52°C durante 33 segundos, seguidos de 72°C durante 5 minutos y finalmente 40°C durante 2 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Tabla 3. En este experimento, la amplificación en presencia de dUTP es aproximadamente tan eficiente como la amplificación en presencia de dUTP y dTTP.

Tabla 3

<i>Amplificación (valores medios de Ct) de 10.000 copias de la Diana 2 en presencia de dUTP o de una mezcla de dUTP y dTTP</i>		
	dUTP	dUTP + dTTP
Ct promedio*	26,2	25,9
Desviación estándar	0,05	0,2
* Promedio de cinco pruebas		



**Ejemplo 4**

*Efecto de concentraciones crecientes de UNG sobre un amplicón pobre de dT(dU)*

5 En este ejemplo, se utilizó como diana para la amplificación el amplicón de la Diana 2, generado utilizando una mezcla de nucleótidos que contenía dUTP 0,5 mM y dTTP 0,05 mM, tal como se describe en el ejemplo 3 (dU+T total 23%). El amplicón se purificó utilizando el kit de purificación de PCR QIAQUICK® (Qiagen, Valencia, CA) y se cuantificó mediante espectrofotometría. Las amplificaciones se realizaron con 1.000, o 10.000 copias del amplicón añadidas a plasma humano de donantes sanos, se procesó con el instrumento COBAS AmpliPrep (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de UNG. La RT-PCR se llevó a cabo con las secuencias de cebadores y diana, los reactivos y el perfil de temperaturas descritos en el Ejemplo 3, excepto en que se añadió la cantidad de UNG indicada. La amplificación y detección se realizó en un instrumento COBAS TaqMan® utilizando el perfil de temperaturas siguiente: 50°C durante 2 minutos (etapa UNG), 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 minutos (etapa RT), 5 ciclos de 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 59°C durante 21 segundos (hibridación y extensión), 55 ciclos de 91°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 52°C durante 33 segundos (hibridación y extensión). Los resultados se muestran en la Figura 4 y la Tabla 4. Como muestran los datos de la Tabla 4, el amplicón pobre en dU sobrevivió incluso al tratamiento con 60 unidades/100µl de UNG (seis veces la cantidad recomendada).

*Tabla 4*

Amplificación de 10.000 copias de un amplicón pobre en dT(dU) tras el pretratamiento con cantidades crecientes de UNG						
Sin UNG	10u UNG	20u UNG	30u UNG	40u UNG	50u UNG	60u UNG
23,2*	35,6	37,3	36,6	41,9	40,0	41,6

\* Cada valor es el promedio de dos experimentos independientes

**Ejemplo 5**

*Amplificación de secuencias que contienen dU y dT tras pretratamiento con UNG*

25 En este ejemplo, se realizaron pretratamiento con UNG y RT-PCR en tiempo real tal como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Los resultados demuestran que el amplicón que posee dT y dU es más persistente, es decir, más difícil de eliminar que el amplicón que contiene solamente dU.

*Tabla 5*

Amplificación de secuencias que contienen dU y dT+dU con o sin pretratamiento con UNG				
Nº de copias de amplicón añadidas	Amplicón solamente con dU		Amplicón con dT y dU	
	+ UNG	Sin UNG	+ UNG	Sin UNG
100.000	31,8*	20,3	28,0	19,9
10.000	34,5	23,9	31,5	23,4
1.000	37,2**	27,3	43,7	27,0
100	ND***	31,1	39,7**	29,7
10	ND	ND	49,7**	35,9

\* cada valor es el promedio de dos experimentos independientes  
 \*\* representa un solo valor, los otros dos experimentos presentaron un valor ND  
 \*\*\* ND: No detectado

**Ejemplo 6**

*Amplificación tras pretratamiento con UNG y en presencia de espermina*

35 En este ejemplo, se amplificó una diana que contenía dU y dT tras pretratamiento con UNG tal como se describe en el Ejemplo 4, excepto en que la mezcla de reacción de amplificación contenía también 100 µM de espermina. Los resultados se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 6. En comparación con la Tabla 5, los datos muestran una mejoría de 1.000 veces o más en el control de la contaminación.

Tabla 6

Amplificación de secuencias que contienen dU y dT+dU tras pretratamiento con UNG y en presencia de 100 µM de espermina		
Nº de copias de amplicón añadidas	Sin UNG	UNG 20 U
1.000.000	16,1 *	38,7
100.000	19,7	41,4**
10.000	23,3	ND***
1.000	26,7	ND
100	30	ND

\* cada valor es el promedio de dos experimentos independientes  
 \*\* representa un solo valor, los otros dos experimentos presentaron un valor ND  
 \*\*\* ND: No detectado

**Ejemplo 7**

5 *Amplificación tras pretratamiento con UNG a diversas temperaturas en presencia de espermina*

En este ejemplo, se realizó la amplificación de la diana que contiene dT y dU tal como se describe en el Ejemplo 6, con la excepción de que el tratamiento con UNG se realizó a 45°C o a 50°C. La reacción de control no contenía UNG ni espermina. La reacción de ensayo contenía UNG y espermina. Los resultados se muestran en la Tabla 7. En este experimento, el método funciona mejor a 50°C que a 45°C.

10

Tabla 7

Amplificación de secuencias que contienen dU y dT+dU con o sin pretratamiento con UNG a 50°C y 45°C				
Nº de copias de amplicón añadidas	50°C		45°C	
	Sin UNG espermina	UNG 20U + espermina 100µM	Sin UNG espermina	UNG 20U + espermina 100µM
1.000.000	16,4*	38,0	16,2	39,7
100.000	20,0	ND***	19,8	46,5
10.000	23,4	ND	23,3	ND
1.000	27,1	ND	27,1	ND

\* cada valor es el promedio de dos experimentos independientes  
 \*\*\* ND: No detectado

Mientras que la invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a ejemplos específicos. Será evidente para los expertos en técnica que pueden realizarse diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance de la invención no debe quedar limitado por ninguno de los ejemplos descritos en la misma, si no por las reivindicaciones presentadas más adelante.

15

LISTADOS DE SECUENCIAS

Identificador de secuencia nº 1:

5 Secuencia artificial

5'-TTTGCATGGCTGCUTGATGTCCCCCACT-3'

LISTADO DE SECUENCIA

10 <110> F. Hoffmann-La Roche AG  
Roche Diagnostics GmbH

15 <120> MÉTODO MEJORADO PARA LA PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN CRUZADA EN TECNOLOGÍAS  
DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> 24623 EP-KOE

20 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido de ADN que contiene desoxiuracilo

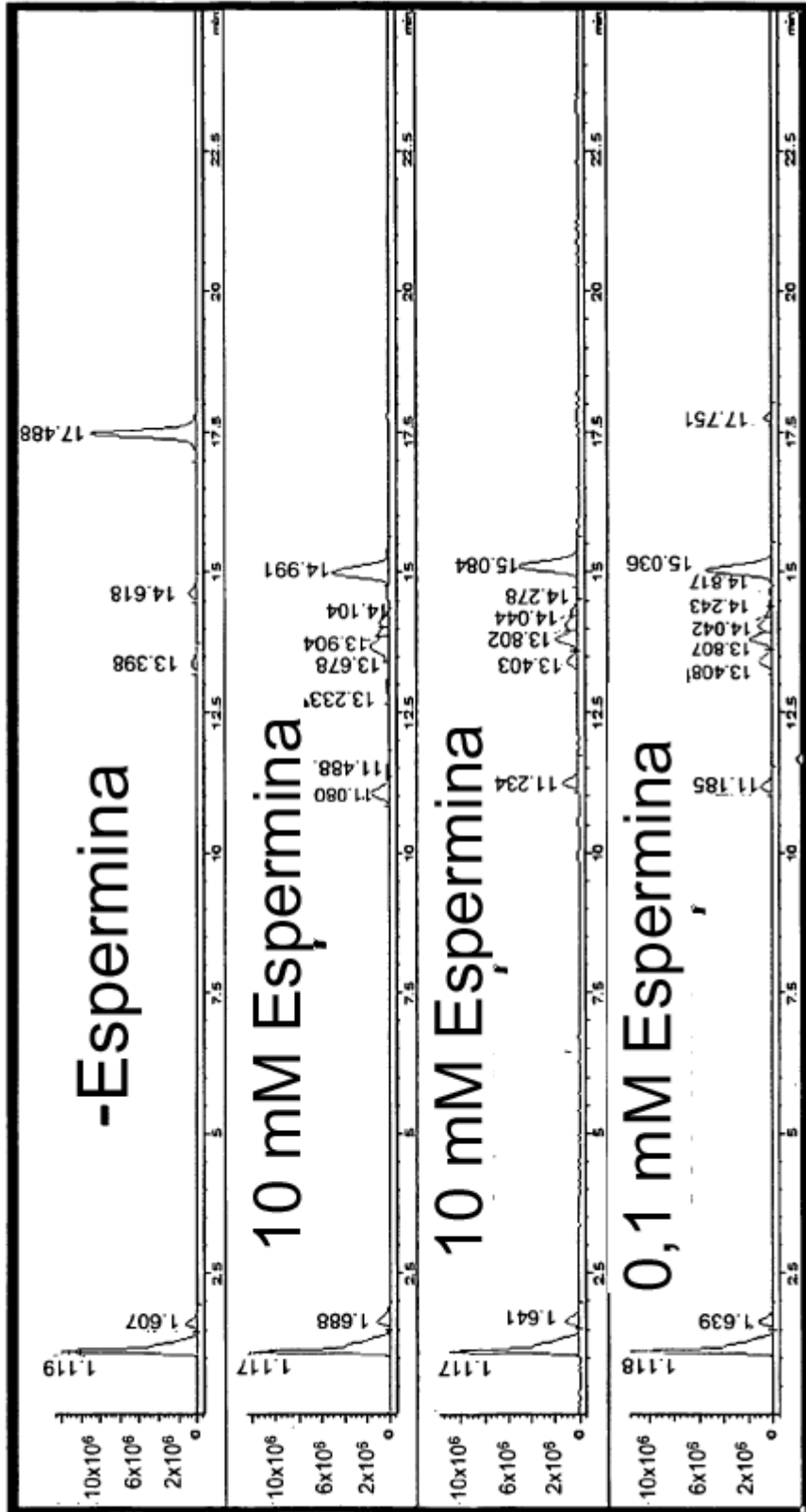
35 <400> 1

tttgcatggc tgcutgatgt cccccact

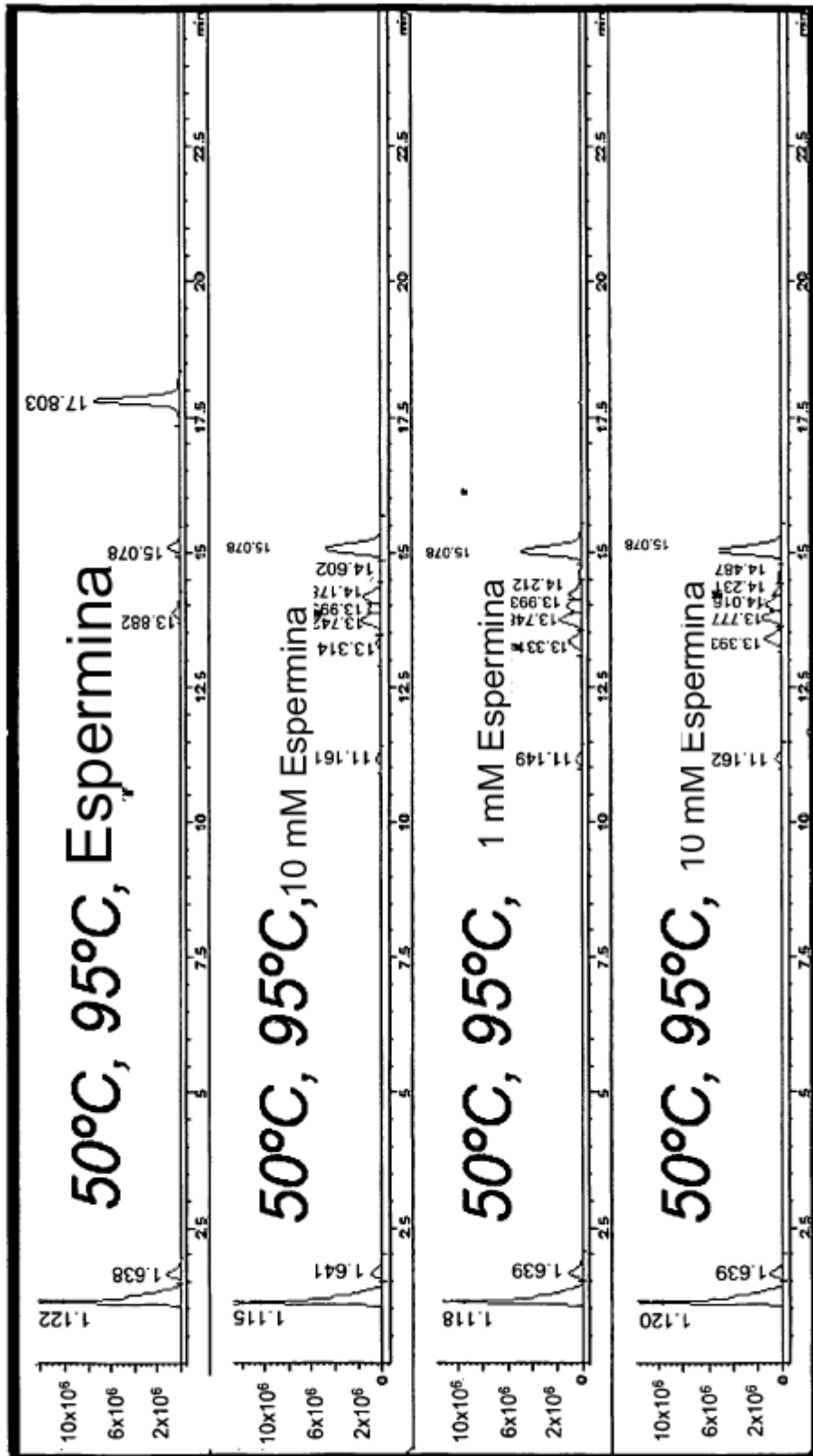
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para disminuir la contaminación cruzada durante la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar una muestra de solución que contiene dicho ácido nucleico;
  - b. amplificar dicho ácido nucleico en presencia de un enzima que posee actividad ADN glicosilasa para generar ADN con al menos un sitio abásico;
  - 10 c. proporcionar al menos un reactivo que facilite la degradación del ADN abásico, siendo dicho reactivo una poliamina;
  - d. incubar dicha solución muestra en condiciones adecuadas para provocar la degradación de dicho ADN con al menos un sitio abásico
- 15 2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha actividad glicosilasa es la actividad uracilo-N-ADN glicosilasa.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha poliamina es una poliamina intercaladora.
- 20 4. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha poliamina se selecciona del grupo formado por espermidina, espermina, trietilentetramina y trimetilendiamina.
5. Mezcla de reacción para evitar la contaminación cruzada durante la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un ácido nucleico, que comprende:
- 25 reactivos útiles para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo dichos reactivos uno o más oligonucleótidos cebadores, una polimerasa de ácidos nucleicos, tampones, sales y nucleósidos trifosfato incluyendo dATP, dCTP, dGTP y uno o más entre dTTP y dUTP, un reactivo adecuado para generar ADN con al menos un sitio abásico y un reactivo que facilita la degradación del ADN abásico, poseyendo dicho reactivo adecuado para generar ADN con al menos un sitio abásico actividad uracilo-N-ADN glicosilasa y dicho reactivo que facilita la degradación del ADN
- 30 abásico una poliamina.
6. Mezcla de reacción según la reivindicación 5, en la que dicho reactivo adecuado, para generar ADN con al menos un sitio abásico, es un enzima.
- 35 7. Kit para llevar a cabo un método de prevención de la contaminación cruzada durante la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un ácido nucleico, que comprende:
- a. un reactivo que posee actividad ADN glicosilasa,
  - b. un reactivo capaz de degradar el ADN abásico, siendo dicho reactivo una poliamina, y
  - 40 c. reactivos útiles para amplificar ácidos nucleicos, incluyendo dichos reactivos útiles para amplificar ácidos nucleicos uno o más oligonucleótidos cebadores, una polimerasa de ácidos nucleicos, tampones, sales, y nucleósidos trifosfato incluyendo dATP, dCTP, dGTP y uno o más entre dTTP y dUTP.

FIG. 1A

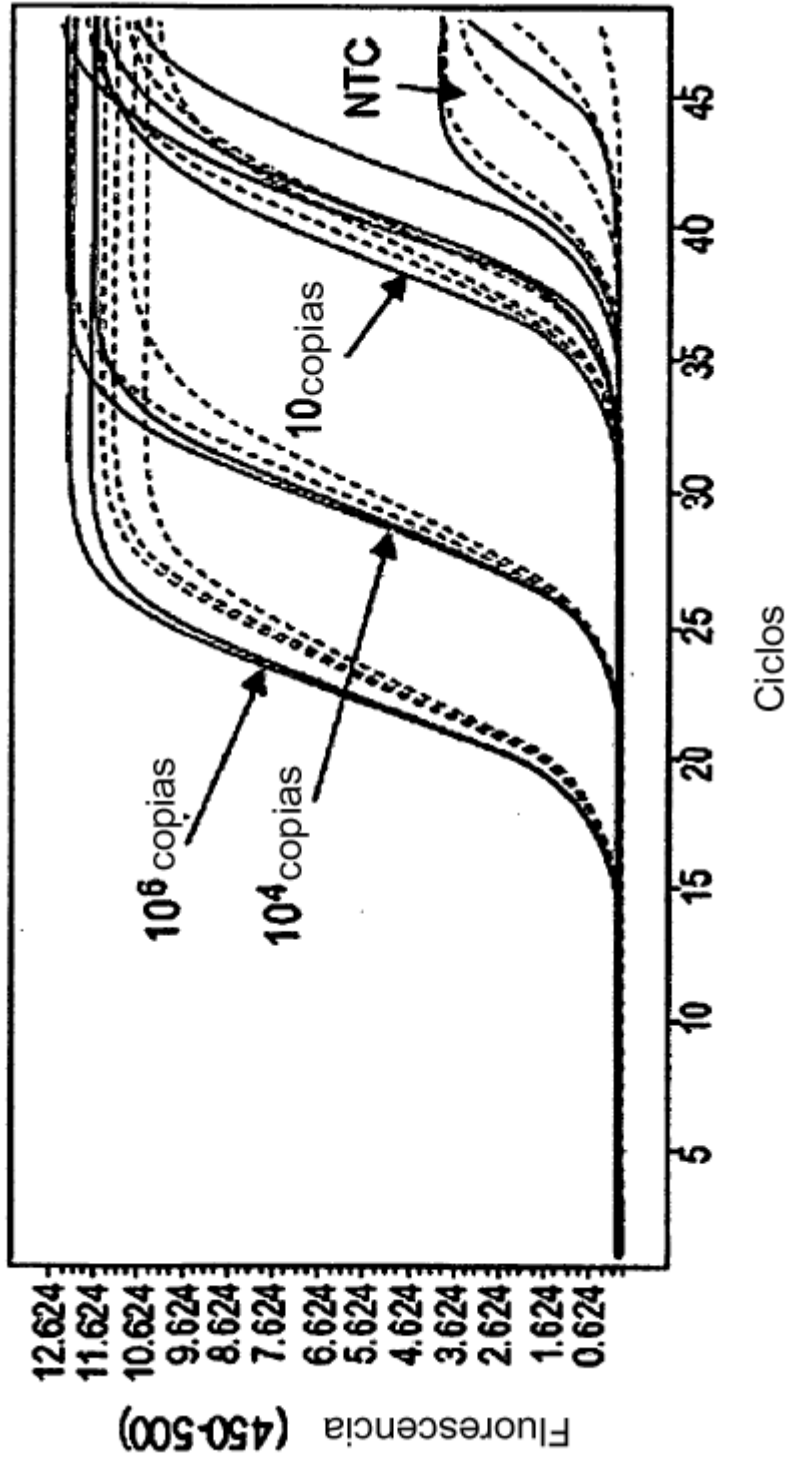


**FIG. 1B**



# FIG. 2A

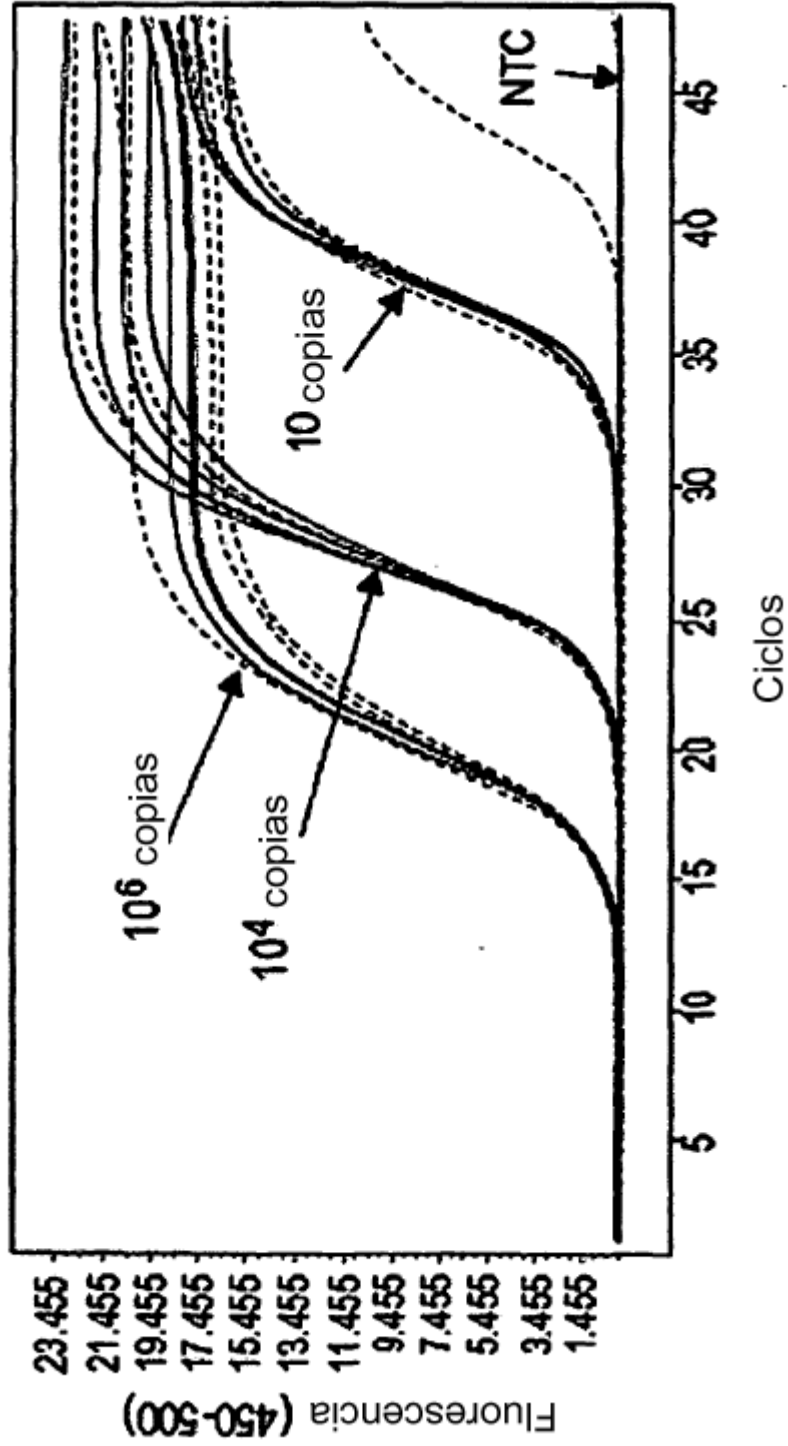
Curvas de amplificación



NTC:Control sin molde

# FIG. 2B

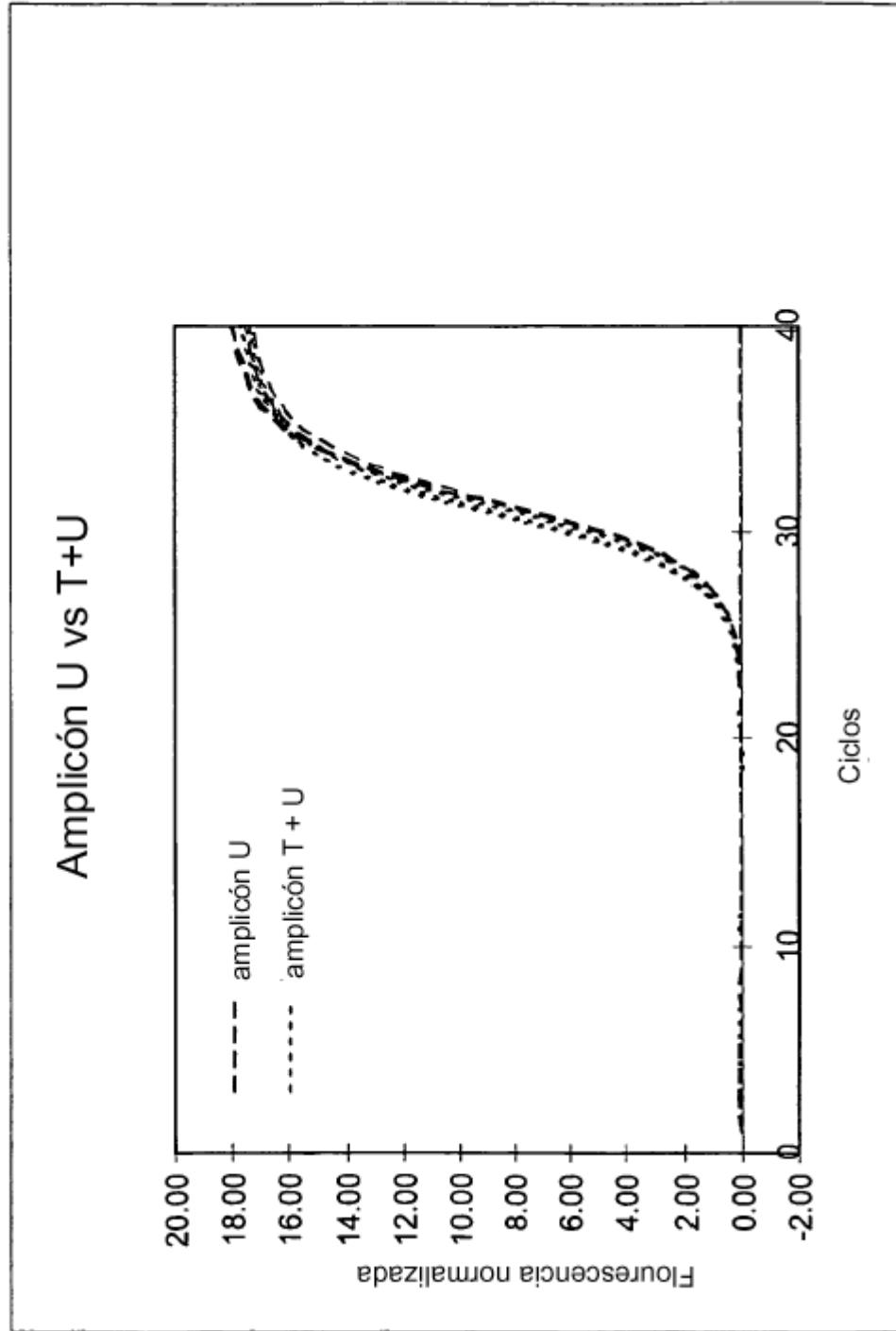
Curvas de amplificación



NTC: Control sin molde



**FIG. 3**



**FIG. 4**

