

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 073**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10795943 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2510118**

54 Título: **Amplificación preferente de ARNm respecto a ADN utilizando cebadores modificados químicamente**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285678 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.01.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**STEINER, LORI;
TSAN, ALISON;
WILL, STEPHEN G. y
NEWTON, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 440 073 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Amplificación preferente de ARNm respecto a ADN utilizando cebadores modificados químicamente

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de la amplificación de los ácidos nucleicos y más concretamente al campo de la amplificación del ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa es un método para generar y amplificar exponencialmente copias de ADN a partir de un molde de ADN. El método presenta aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas en el campo de la expresión génica. El método permite tanto detectar como medir los niveles de ARNm expresados por un organismos.

La principal dificultad de la RT-PCR es la contaminación de las preparaciones de ARN con ADN genómico. Tal como admiten el distribuido principal de reactivos y tecnologías de aislamiento de ARN, la mayoría de técnicas de aislamiento de ARN proporcionan ARN con una cantidad significativa de ADN genómico contaminante (Ambion, Austin, Tex., (Life Technologies, Inc.), Technical Bulletin nº 176, "Avoiding DNA contamination in RT-PCR"). La contaminación de ADN resulta especialmente problemática para la RT-PCR, en la que una cantidad mínima de ADN contaminante será amplificada exponencialmente. Un método para reducir la amplificación del ADN mediante RT-PCR implica el pretratamiento de las muestras con una desoxirribonucleasa, tal como ADNasa I; ver Huang et al., Biotechniques 20:1012-1020, 1996. Desafortunadamente, este enfoque no está exento de problemas. Tras el pretratamiento, la ADNasa debe inactivarse por completo para evitar la digestión de los amplicones de ADN nacientes durante el curso de la RT-PCR. Sin embargo, las elevadas temperaturas necesarias para completar la inactivación de la ADNasa causan la degradación del molde de ARN. A modo de alternativa al calentamiento, puede eliminarse químicamente la ADNasa mediante extracción con fenol o utilizando diversos reactivos complejos y costosos que eliminan la ADNasa de la mezcla de reacción. En resumen, la utilización de ADNasa no resulta práctica en la RT-PCR, ya que requiere múltiples etapas adicionales y con frecuencia amenaza la frágil diana de ARN.

Debido a que el problema de la contaminación con ADN se considera intratable, los esfuerzos se han dirigido a prevenir la amplificación del ADN contaminante mediante la RT-PCR. Una de estas estrategias aprovecha la presencia de intrones en el ADN genómico eucariótico. En el ARNm maduro, no hay intrones. En el caso de que los cebadores se diseñen para flanquear un intrón, éste se encontrará ausente del amplicón generado a partir de ARNm. Sin embargo, el intrón se incluirá en el amplicón de RT-PCR generado a partir del molde de ADN genómico correspondiente. En el caso de que el intrón sea suficientemente grande, la secuencia de ARNm más corta (y posteriormente la secuencia de ADNc) será amplificada preferentemente, mientras que el ADN genómico será amplificado menos eficientemente o no será amplificado en absoluto (Ambion, Tech. Bull. nº 176). En el peor de los casos, el ADN genómico será coamplificado con la diana de ARNm deseada, pero los dos amplicones podrán distinguirse mediante electroforesis.

Desafortunadamente, el diseño del cebador no siempre puede superar el problema de contaminación con ADN. Muchos ensayos de PCR ahora implican PCR en tiempo real, una técnica que no incluye electroforesis pero que puede detectar ácidos nucleicos simultáneamente con la amplificación; ver las patentes US nº 5.994.056 y nº 5.876.930 y patentes relacionadas. Sin electroforesis, la PCR en tiempo real no puede eliminar en el análisis los amplicones de tamaño diferente generados con el mismo juego de cebadores. Cualquier sonda de PCR en tiempo real que detecte una diana de ARNm inevitablemente también detectará el contaminante de ADN genómico correspondiente. No se distinguirá un ARNm de su ADN genómico correspondiente. Por lo tanto, en el caso de que los intrones en la región de interés sean excesivamente pequeños para impedir la amplificación de ADN genómico, no podrá utilizarse la PCR en tiempo real.

Por lo tanto, resulta deseable crear un nuevo método de diseño de cebadores que garantiza que los contaminantes de ADN genómico no sean coamplificados con el ARNm durante la RT-PCR. Dicho método de diseño de cebadores permitiría la amplificación cuantitativa de dianas de ARNm con independencia del tamaño del intrón presente en el amplicón.

60 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para amplificar selectivamente una diana de ARN mensajero en una muestra, que comprende una unión exón-exón, que comprende las etapas de: a) hibridar un primer oligonucleótido con dicha diana de ARNm y llevar a cabo síntesis de ADN dirigida por ARN utilizando por lo

menos un enzima capaz de síntesis dirigida por ARN, en el que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido modificado en el grupo amino exocíclico, es por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARN, y comprende una unión exón-exón en la diana, y b) amplificar el producto de la etapa a) utilizando dicho primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con por lo menos un enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN, en el que dicho segundo oligonucleótido es por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm. También se dan a conocer oligonucleótidos, mezclas de reacción y kits para la puesta en práctica de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una representación esquemática de una unión exón-exón tal como se define posteriormente en la presente memoria en el contexto de la invención, mostrada como un cebador que comprende la unión exón-exón.

La figura 2 es una representación esquemática de un diseño de cebador según la presente invención.

La figura 3 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 3 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 4 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 6 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 5 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 7 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 6 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 10 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 7 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 11 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 8 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 12 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 9 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 13 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 10 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 14 utilizado en el método según la presente invención.

La figura 11 muestra una curva de amplificación utilizando el cebador SEC ID nº 15 utilizado en el método según la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

En la descripción y reivindicación de la presente invención se utilizarán las definiciones siguientes. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención.

La expresión "ARN mensajero" o "ARNm" se refiere al ARN que es transcrito a partir de ADN genómico y que porta la secuencia codificante para la síntesis de proteína. En los organismos eucarióticos, la secuencia de nucleótidos del ARNm se modifica con el fin de formar la secuencia codificante de proteína. Típicamente, la modificación implica el "procesamiento" o eliminación de los intrones de la secuencia de ARNm. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos del ARNm se modifica mediante "edición" con el fin de formar la secuencia codificante de proteína.

En el contexto de la síntesis de ARNm, la expresión "ADN genómico correspondiente" se refiere al ADN genómico que contiene el molde para el ARNm en cuestión. El ADN genómico correspondiente puede contener secuencias adicionales que son similares o complementarias al molde del ARNm, tal como el gen en cuestión, así como duplicaciones de ese gen y pseudogenes. Típicamente, el ADN genómico correspondiente procede del mismo organismo que el ARNm; sin embargo, el ADN genómico correspondiente puede proceder de un organismo diferente, tal como en el caso de determinados virus. En el caso de los retrovirus que existen en forma de ARN, el ADN genómico correspondiente puede ser ADN del huésped que contiene un provirus (ADN vírico integrado).

La expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc) y comprende ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos péptido nucleicos (APN), conjugados de APN-ADN, conjugados de APN-ARN, etc., que comprenden nucleótidos unidos covalentemente entre sí, de manera lineal o ramificada. Un ácido nucleico típicamente es de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925, 1993), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321), enlaces O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1992), y esqueletos y enlaces de ácido péptido (ver Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895, 1992). Entre otros análogos de ácidos nucleicos 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) y esqueletos no de ribosa, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506. Los ácidos nucleicos que comprenden uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.*, páginas 169 a 176, 1995) y también se describen análogos en, por ejemplo, Rawls C. y E., *News 2* de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden llevarse a cabo para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcajes, 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 ácidos nucleicos también pueden incluir análogos de nucleótidos con bases heterocíclicas no naturales, tales como las indicadas en, por ejemplo, Seela et al., *Helv. Chim. Acta* 82: 1640, 1999. Determinadas bases utilizadas en los análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_f). Por ejemplo, entre algunos de ellos se incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), 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. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina y sus derivados.

Un "nucleósido" se refiere a un componente ácido nucleico que comprende una base o grupo básico (que comprende por lo menos un anillo homocíclico, por lo menos un anillo heterocíclico, por lo menos un grupo arilo y/o similares) unido covalentemente a una fracción sacárida, un derivado de una fracción sacárida o un equivalente funcional de una fracción sacárida (por ejemplo un anillo carbocíclico). Por ejemplo, en el caso de que un nucleósido incluya una fracción sacárida, la base típicamente se une a una posición 1' de esa fracción sacárida. Tal como se ha indicado anteriormente, una base puede ser una base natural o una base no natural. Entre los nucleósidos ejemplares se incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, dideoxirribonucleósidos y nucleósidos carbocíclicos.

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo un éster fosfato de un nucleósido, que presenta uno, dos, tres o más grupos fosfato unidos covalentemente a una fracción sacárida o a su derivado o equivalente.

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos, aunque típicamente 5 a 50 nucleótidos y más típicamente, entre 15 y 35 nucleótidos. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo la función o uso final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos pueden prepararse mediante cualquier método adecuado conocido de la técnica, incluyendo, por ejemplo, la clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método de fosfotriéster de Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862, 1981; el método de triéster de Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191, 1981; los métodos de síntesis automática; el método de soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, o cualquier otro método químico conocido de la técnica.

Un "cebador" es un oligonucleótido que puede hibridarse con un ácido nucleico de molde y permitir la extensión o alargamiento de la cadena utilizando un enzima que incorpora nucleótidos. Aunque en ocasiones se utilizan otras longitudes de cebador, los cebadores típicamente presentan un tamaño comprendido entre 15 y 35 nucleótidos. Los cebadores cortos generalmente utilizan temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos de molde. Un cebador que es por lo menos parcialmente complementario respecto a una subsecuencia de un ácido nucleico de molde típicamente resulta suficiente para hibridarse con el ácido nucleico de molde para que se produzca la extensión. Sin embargo, el éxito de la extensión generalmente requiere una mayor complementariedad (es decir, menos correspondencias erróneas con el molde) en el extremo 3' del cebador. Un cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante técnicas radiológicas, espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas o químicas.

La "extensión de cebador" es la acción del enzima por la que se añaden nucleótidos adicionales al cebador.

Un "ácido nucleico de molde", "molde" o "diana" se refiere a un ácido nucleico con el que puede hibridarse un cebador y ser extendido bajo las condiciones adecuadas. En el contexto de la amplificación de ácidos nucleicos, "diana" es preferentemente una región de un ácido nucleico que consiste de las secuencias por lo menos parcialmente complementarias a por lo menos dos secuencias de cebador y la secuencia intermedia. Los ácidos nucleicos de molde o diana pueden existir en forma de fragmentos aislados de ácidos nucleicos o constituir una parte de un fragmento de ácido nucleico de mayor tamaño. Los ácidos nucleicos diana pueden derivarse o aislarse a partir de esencialmente cualquier fuente biológica, tal como microorganismos, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, incluyendo muestras o tejidos y sueros de pacientes humanos, tejidos o muestras antiguos o conservados, aislados ambientales o similares. Además, entre los ácidos nucleicos de molde opcionalmente se incluyen o se derivan a partir de ADNc, ARN, ADN genómico, ADN genómico clonado, bibliotecas de ADN genómico, ADN o ARN fragmentado enzimáticamente, ADN o ARN fragmentado químicamente, ADN o ARN fragmentado físicamente, o similares. Los ácidos nucleicos también pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas.

Un ensayo de "PCR en tiempo real" es un ensayo de PCR en el que se detecta y se cuantifica el amplicón durante el curso de ciclos de PCR. Un ensayo de PCR en tiempo real típico implica la detección óptica del producto de amplificación que tiene lugar repetidamente durante el ciclado. La medición de la amplificación es el "ciclo umbral" o "Ct", un ciclo en el que se detecta por primera vez fluorescencia superior al nivel de fondo. Un valor de Ct más temprano refleja que se ha alcanzado rápidamente el nivel umbral y, de esta manera, una entrada inicial de molde más elevada o una amplificación más eficiente. Un valor de Ct más tardío podría reflejar una cantidad más pequeña de entrada inicial de molde o una amplificación ineficiente o inhibida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "gen" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado a una función biológica. De esta manera, entre los genes se incluyen secuencias codificantes, secuencias no codificantes intermedias (intrones) y, opcionalmente, las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de las secuencias codificantes.

Una "fracción" o "grupo" se refiere a una de las partes en las que se divide una entidad, tal como una molécula (por ejemplo un grupo funcional, un grupo sustituyente, o similar). Por ejemplo, un nucleótido típicamente comprende un grupo base (por ejemplo adenina, timina, citosina, guanina, uracilo o un análogo), una fracción sacárida, y uno o más grupos fosfato.

Un "grupo alquilo" se refiere a una fracción hidrocarburo saturada lineal, ramificada o cíclica e incluye todos los isómeros posicionales, por ejemplo metilo, etilo, propilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo, n-hexilo, ciclohexilo, n-heptilo, n-octilo, 2-etilhexilo, n-nonilo, n-decilo y similares. Un grupo alquilo típicamente comprende aproximadamente 1 a 20 átomos de carbono y más típicamente comprende aproximadamente 2 a 15 átomos de carbono. Los grupos alquilo puede encontrarse sustituidos o no sustituidos.

Un ensayo de amplificación es "selectivo" o "selectivo de diana" en el caso de que rinda una predominancia (es decir, una mayoría aunque menos de 100%) de un producto respecto a otros posibles productos. Se describe un ensayo como "selectivo" con la condición de que la amplificación de la variante no deseada de la secuencia diana sea detectable. El ensayo en el que la amplificación de la diana no deseada no sea detectable se denomina "específico". A medida que los métodos de detección son más sensibles, algunos ensayos que previamente se conocían como específicos, resultan ser meramente selectivos, es decir, la amplificación de variantes no deseadas de la diana se convierte en detectable. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término "específico" pretende comprender la amplificación tanto estrictamente específica de diana como la selectiva de diana.

Un "ácido nucleico complementario" es un ácido nucleico o un segmento de ácido nucleico que puede hibridarse o formar un dúplex con por lo menos una subsecuencia de otro ácido nucleico. La complementariedad no es necesario que sea perfecta para que se forme un dúplex, es decir, los ácidos nucleicos en un dúplex pueden ser "parcialmente complementarios". El experto en la materia de la tecnología de ácidos nucleicos puede determinar la estabilidad de los dúplex mediante la consideración empírica de varias variables, incluyendo, por ejemplo, la longitud de una región de complementariedad, la composición de bases y la secuencia de nucleótidos en una región de complementariedad, la fuerza iónica de la solución de ácidos nucleicos y la incidencia de pares de bases erróneamente apareadas.

Un término "detectable" con respecto a un analito, tal como un ácido nucleico en una muestra, se refiere a detectable utilizando los métodos de detección del estado de la técnica. Se entiende que a medida que mejoren los métodos de detección, los niveles actualmente indetectables pueden convertirse en detectables. Por lo tanto, el término "detectable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad de medir la presencia o ausencia de una especie utilizando técnicas analíticas apropiadas que se encuentran y son razonablemente disponibles y

prácticas en el contexto de laboratorio y que son conocidas por el experto en la materia.

Un "enzima que incorpora nucleótidos" se refiere a un enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Entre los enzimas que incorporan nucleótidos ejemplares se incluyen las ADN polimerasas, las ARN polimerasas, las terminal-transferasas, las transcriptasas inversas, las telomerasas y similares.

Un "enzima termoestable" se refiere a un enzima que es estable (es decir, que resiste la degradación o desnaturalización) y que conserva suficiente actividad catalítica al someterlo a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para llevar a cabo las reacciones posteriores de extensión de cebadores al someterla a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar 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 las patentes US nº 4.683.202 y nº 4.683.195. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable típicamente resulta adecuada para la utilización en una reacción de ciclado de la temperatura, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Entre los ejemplos de polimerasa de ácidos nucleicos termoestables se incluyen la ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, la polimerasa Z05 de *Thermus*, la polimerasa de *Thermus flavus*, las polimerasas de *Thermotoga maritima*, tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, la ADN polimerasa Tth, y similares.

Un enzima "modificado" se refiere a un enzima que comprende un polímero de aminoácidos en el que por lo menos un monómero diferente de la secuencia de referencia, tal como una forma nativa o de tipo salvaje del enzima u otra forma modificada del enzima. Entre las modificaciones ejemplares se incluyen las inserciones, deleciones y sustituciones de monómeros. Entre los enzimas modificados también se incluyen enzimas quiméricos que presentan secuencias componentes identificables (por ejemplo dominios estructurales o funcionales, etc.) derivados de dos o más moléculas parentales. También se encuentran incluidas en la definición de enzimas modificados aquellos que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Entre los ejemplos de polimerasas modificadas se incluyen la ADN polimerasa G46E E678G CS5, la ADN polimerasa CS5 G46E L329A E678G, ADN polimerasa CS5 G46E L329G D640G S671F, ADN polimerasa CS5 G46E L329A D640G S671F E678G, ADN polimerasa CS6 G46E E678G, polimerasa Δ Z05, polimerasa Δ Z05-Gold, polimerasa Δ Z05R, ADN polimerasa Taq E615G, polimerasa TMA-25 E678G, polimerasa E678G TMA-30 y similares.

La expresión "actividad de nucleasa 5' a 3'" o "actividad de nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácidos nucleicos típicamente asociada a la síntesis de una cadena de ácidos nucleicos, en la que se eliminan nucleótidos del extremo 5' de una cadena de ácidos nucleicos, por ejemplo la ADN polimerasa I de *E. coli* presenta esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la presenta.

Una polimerasa que "no presenta sustancialmente actividad de nucleasa 5'-3'" se refiere a una polimerasa que presenta 50% o menos (por ejemplo <25%, <20%, <15%, <10%) de actividad de nucleasa 5'-3' que la ADN polimerasa Taq. Los métodos para medir la actividad de nucleasas 5'-3' y las condiciones de la medición son bien conocidas de la técnica. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.466.591. Entre los ejemplos de ADN polimerasas que sustancialmente no presentan actividad de nucleasa 5' a 3' se incluyen el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) que no presenta los 235 aminoácidos N-terminales (por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 5.616.494 y que en la técnica se denomina comúnmente "fragmento Stoffel"). Entre otros ejemplos se incluyen una ADN polimerasa termoestable que presenta suficientes deleciones (por ejemplo deleciones N-terminales), mutaciones o modificaciones de manera que se elimina o inactiva el dominio responsable de la actividad de nucleasa 5' a 3'. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.795.762.

Un "marcaje" se refiere a una fracción unida (covalente o no covalentemente) a una molécula y capaz de proporcionar información sobre la molécula. Entre los marcajes ejemplares se incluyen marcajes fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes bioluminiscentes, marcajes radioactivos, grupos modificadores de la masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos y enzimas (incluyendo peroxidasas, fosfatasas, etc.).

Un "exón" es un ácido nucleico presente en ADN genómico y en la forma madura del ARN mensajero. La secuencia del exón es una parte de un gen que se traduce en una proteína. Los exones comúnmente contienen secuencias codificantes que son partes del marco de lectura abierta (ORF).

La expresión "unión exón-exón" se refiere a una unión entre dos exones que resulta de la unión de dos exones tras la eliminación del intrón contiguo a dichos exones.

La expresión "un primer oligonucleótido que comprende una unión exón-exón en la diana" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de comprender dos exones que se encuentran separados por un intrón en un oligonucleótido diana. Se proporciona la figura 1 meramente a título ilustrativo. La figura 1 es una representación esquemática de un oligonucleótido típico que comprende exones e intrones. La figura 1 muestra un ejemplo de una

unión exón-exón en dicho oligonucleótido y un primer oligonucleótido que comprende esta unión se representa mediante una flecha. El primer oligonucleótido comprende la unión exón-exón mediante la hibridación con los dos exones contiguos al intrón, y no con el intrón.

5 Un "intrón" se refiere a un ácido nucleico presente en ADN genómico y en la forma madura del ARN mensajero. Una secuencia de intrón es una parte de un gen que no se transcribe en ARN ni se traduce en proteína.

10 La expresión "expresión génica" se refiere al procedimiento por el que se utiliza información de un gen en la síntesis de un producto génico funcional, tal como una proteína o ARN funcional. Una parte de la expresión génica típicamente implica copiar una parte de la molécula de ADN genómico en una molécula de ARN mediante el procedimiento conocido como "transcripción". Los estudios de expresión génica implican estudiar el ARN o proteína sintetizado utilizando la información en el gen.

15 La expresión "transcripción inversa" se refiere al procedimiento de generar una molécula de ADN de doble cadena a partir de un molde de ARN de cadena sencilla. La transcripción inversa se encuentra catalizada por una polimerasa de ácidos nucleicos con actividad de transcriptasa inversa.

20 La expresión "reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)" es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que una cadena de ARN en primer lugar se transcribe inversamente en su complemento de ADN (ADNc) y el ADNc resultante se amplifica utilizando la PCR tradicional. La RT-PCR requiere un enzima con actividad de transcriptasa inversa y un enzima preferentemente termoestable con actividad de ADN polimerasa. En algunos casos, las dos actividades se encuentran presentes en el mismo enzima.

25 Un "inicio en caliente", en el contexto de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, se refiere a un protocolo en el que se retiene por lo menos un reactivo crítico de la mezcla de reacción (o, en caso de encontrarse físicamente presente en la mezcla de reacción, el reactivo permanece inactivo) hasta que se eleve la temperatura suficientemente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria del cebador o cebadores. Un "enzima de inicio en caliente" es un enzima, típicamente una ácido nucleico polimerasa, capaz de actuar como el reactivo "retenido" o inactivo en un protocolo de inicio en caliente. Dicho enzima de inicio en caliente puede obtenerse, por ejemplo, modificando químicamente el enzima. Un ejemplo no limitativo de dicho enzima químicamente modificado es la Taq Eagle disponible comercialmente. Estos enzimas de inicio en caliente también pueden obtenerse con un anticuerpo o un aptámero que se une a una polimerasa, tal como es el caso, por ejemplo, en Hawk Z05, disponible comercialmente.

35 El término "indetectable" se refiere a una falta de detección mediante los métodos de detección puestos en práctica en el momento de la presente invención. Debe entenderse que el término "indetectable" no se refiere a la ausencia completa de una sustancia para la que se busca la detección. Se refiere a que los métodos convencionales conocidos en el momento de la presente invención no permiten la detección de una sustancia para la que se busca la detección.

40 La expresión "especificidad analítica" se refiere a la cantidad de ácido nucleico diana no deseado con la que el ensayo todavía es específico para el ácido nucleico diana deseado. Por ejemplo, en un ensayo de amplificación de ARNm, "especificidad analítica para 1 microgramo de ADN genómico" se refiere a que, en el caso de que el nivel de contaminación de ADN genómico sea 1 microgramo por reacción, el ADN no resulta amplificado detectablemente, mientras que el ARNm resulta amplificado detectablemente.

50 La presente invención proporciona un método de amplificación preferente del ARN mensajero en presencia de contaminante de ADN genómico utilizando cebadores modificados químicamente. La presente invención comprende métodos, kits y mezclas de reacción útiles para la amplificación y detección preferentes de ARNm respecto a ADN en las muestras. La presente invención puede utilizarse para detectar, identificar y cuantificar el ARNm de diversos organismos eucarióticos y tejidos de organismos eucarióticos, incluyendo tejidos y muestras de pacientes en aplicaciones clínicas.

55 Una aplicación ejemplar de cuantificación del ARNm es un estudio de expresión génica. Los estudios de expresión génica son una parte de la investigación básica y aplicada, así como del diagnóstico clínico. En las aplicaciones clínicas, el nivel del ARN mensajero podría reflejar la progresión de una enfermedad. En la terapia farmacológica, el nivel del ARNm podría indicar la eficacia de un fármaco con diana en una ruta particular de expresión génica. Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos contra la familia de receptores del RFCE resulta en la regulación negativa de varios genes en la ruta del RFCE. Tzahar et al., Biochim. Biophys. Acta 1337:M25, 1998. Los cambios medidos en la expresión de los genes en la ruta del RFCE reflejan la eficacia de un fármaco particular.

60 En un estudio típico, el ARN total o ARNm se aislaría de una muestra y se sometería al procedimiento de análisis de ácidos nucleicos de elección. Desafortunadamente, la similitud entre las propiedades químicas de ARN y ADN

- 5 resultan en el coaislamiento de ambos. En algunos métodos de análisis resulta aceptable la presencia de una cantidad reducida de ADN contaminante. Sin embargo, en los métodos más sensibles basados en la amplificación, tales como la PCR y la RT-PCR, incluso una cantidad reducida de ADN podría distorsionar los resultados del ensayo. En la mayoría de casos, los cebadores y sondas específicos para una especie particular de ARN se hibridan con la secuencia de ADN genómico correspondiente, conduciendo a la coamplificación y codetección del ADN genómico contaminante. De esta manera, la presencia de ADN genómico contaminante crearía un resultado falso positivo, indicando falsamente la expresión génica, o distorsionaría el resultado cuantitativo, indicando un nivel incorrecto de expresión génica.
- 10 El problema de la contaminación de ADN se considera generalmente intratable, es decir, siempre se encontrará presente cierta cantidad de ADN en una preparación de ARN. Por lo tanto, resulta deseable minimizar el efecto del contaminante. En el contexto de la RT-PCR, resulta deseable minimizar la amplificación del ADN contaminante. Como medida de la especificidad hacia el ARNm, cada ensayo específico de ARN puede caracterizarse por su especificidad analítica, o por la cantidad de ADN genómico contaminante a la que el ADN no se coamplifica detectablemente con el ARNm.
- 15 La presente invención es un método de amplificar selectivamente ARNm con especificidad analítica clínicamente aceptable en presencia de ADN genómico. Por ejemplo, en un ejemplo proporcionado para ilustrar aunque no limitar la invención, la especificidad analítica es de 1 microgramo de ADN genómico por reacción. Se reconoce que puede producirse cierta amplificación del contaminante utilizando el método de la presente invención. Sin embargo, un método se consideraría que funciona satisfactoriamente si la amplificación del ADN contaminante presente hasta un determinado nivel máximo aceptable no resulte detectable mediante los métodos de detección del estado de la técnica utilizados.
- 20 Los métodos existentes para reducir o eliminar la amplificación de ADN contaminante en una reacción de RT-PCR aprovechan la presencia de intrones. El ARNm diana diferiría del ADN genómico correspondiente por su falta de secuencias intermedias o intrones. Una manera de evitar la amplificación de ADN genómico contaminante es diseñar cebadores de amplificación que flanqueen un intrón. En el caso de que los cebadores flanqueen un intrón, el ADN genómico rendirá un producto de un tamaño diferente, o en el caso de que el intrón sea prohibitivamente grande, no rendirá ningún producto en absoluto. Desafortunadamente, en algunos casos el intrón en la secuencia de interés no es suficientemente grande para impedir la amplificación. En el caso de que se produzca una amplificación no deseada, resulta necesaria una etapa adicional para separar los productos de amplificación según tamaño con el fin de descartar los contaminantes.
- 25 Otra manera de reducir o eliminar la amplificación del ADN contaminante es aprovechar los intrones mediante el diseño de un cebador que comprende la unión de dos exones. En este caso, el cebador no podría hibridarse y formar un híbrido estable con la secuencia de ADN genómico debido a la presencia del intrón entre la parte 5' y la parte 3' del híbrido de cebador-molde. Desafortunadamente, en la práctica, un método de este tipo no siempre tiene éxito. En algunos casos, se forman híbridos estables entre ADN genómico y el cebador que comprende un intrón.
- 30 Esto puede suceder debido a la "formación de un bucle hacia afuera" del intrón, o debido a una similitud insuficiente entre el extremo 3' del cebador y la secuencia del intrón. Tal como se ilustra en los Ejemplos (Tabla 1), el ADN genómico resulta fácilmente amplificado por PCR en presencia de por lo menos un cebador que comprende la unión exón-exón.
- 35 Se ha descubierto que la especificidad de un cebador que comprende una unión exón-exón para el ARNm puede mejorarse en gran medida mediante determinadas modificaciones químicas.
- 40 Recientemente se ha informado de cebadores de amplificación con nucleótidos modificados químicamente. Por ejemplo, se han descrito en la patente US nº 6.001.611 cebadores que comprenden nucleótidos modificados, específicamente en un nucleótido con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico. La síntesis de dichos nucleótidos, y los oligonucleótidos que incorporan dichos nucleótidos, también se describen en la patente US nº 6.001.611.
- 45 En una realización, la presente invención implica un oligonucleótido para la amplificación selectiva de una diana ARN mensajero (ARNm), que comprende una unión exón-exón, en presencia del ADN genómico contaminante correspondiente. El oligonucleótido comprende una secuencia que es por lo menos parcialmente complementaria a dicha diana de ARNm y que comprende la unión exón-exón en la diana y además por lo menos un nucleótido que presenta una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido.
- 50 La presente invención implica generalmente el diseño y utilización de cebadores oligonucleótidos para amplificar selectivamente regiones específicas del ácido nucleico diana. Los parámetros para el diseño de cebadores de amplificación resultarán familiares para el experto en la materia. Entre los programas útiles para dicho diseño se
- 55
- 60

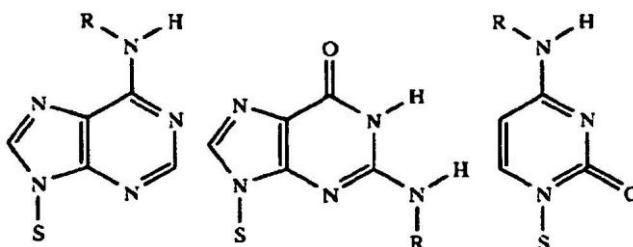
incluyen, por ejemplo, Visual OMP (DNA Software, Inc., Ann Arbor, MI), Oligo 6 (Stratagene, La Jolla, CA), Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, MI) y DNASTar (DNASTar, Inc., Madison, WI).

5 La presente invención implica la utilización de por lo menos un cebador con por lo menos un nucleótido con una base modificada químicamente en el grupo amino exocíclico. Preferentemente, el cebador modificado es el cebador que comprende la unión exón-exón. Los nucleótidos con modificaciones covalentes de los grupos amino exocíclicos han sido descritos en la patente US nº 6.001.611. La síntesis de dichos nucleótidos, y los oligonucleótidos que incorporan dichos nucleótidos se describen también en la patente nº 6.001.611.

10 Según la presente invención, una modificación adecuada del grupo amino exocíclico puede seleccionarse basándose en la presencia de las propiedades siguientes: (1) la modificación interfiere, aunque sin bloquear, el apareamiento de bases de Watson-Crick de la base modificada con la base complementaria en el ácido nucleico de doble cadena, (2) la modificación interfiere, aunque sin bloquear, la extensión del cebador que comprende la base modificada por el enzima de transcripción inversa utilizando el molde de ARN, (3) la modificación permite la síntesis de la cadena complementaria a la cadena que incorpora la base modificada, y (4) la modificación incrementa la selectividad de un cebador que incorpora la modificación para el molde de ARNm respecto al molde de ADN.

20 Entre los ejemplos de grupos amino exocíclicos se incluyen los grupos amino en la posición 6 de la adenosina, en la posición 2 de la guanosina y en la posición 4 de la citidina. Los grupos amino exocíclicos que participan en el apareamiento de bases con la cadena de ácidos nucleicos complementaria también pueden encontrarse presentes en diversas bases nitrogenadas no convencionales en los nucleótidos. Entre los ejemplos de nucleósidos con bases no convencionales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, 3-metiladenosina, 7-metilguanosina, 3-metilguanosina, 5-metilcitidina y 5-hidroximetilcitidina. Las modificaciones adecuadas de grupos amino exocíclicos de dichas bases no convencionales también pueden seleccionarse según el método empírico de la presente invención.

25 Las estructuras de los nucleótidos modificados que comprenden una base modificada adenina, guanina y citosina, respectivamente, se muestran a continuación:



30 en las que S representa la fracción sacárida y R representa el grupo modificador. Se encuentra contemplada una diversidad de grupos modificadores que presentan las cuatro propiedades descritas de manera general anteriormente. En realizaciones preferentes según la presente invención, los grupos modificadores presentan la estructura:



40 en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo no sustituido o sustituido y fenoxi.

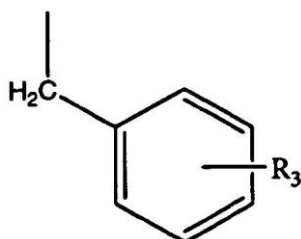
Los grupos alquilo pueden ser ramificados o no ramificados.

Los grupos alquilo pueden ser alquilos C₁-C₂₀, por ejemplo alquilos C₁-C₁₀.

45 Los grupos alcoxi pueden ser alcoxi C₁-C₂₀, por ejemplo alcoxi C₁-C₁₀.

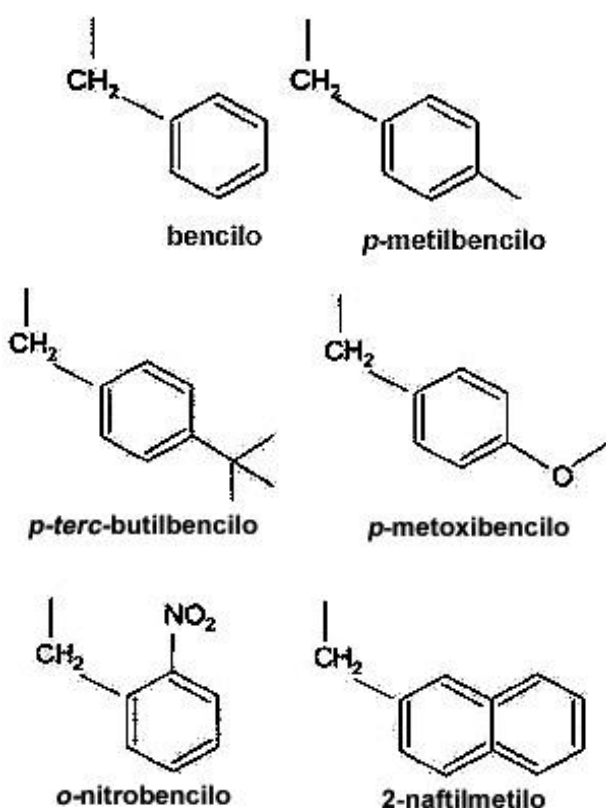
Arilo puede ser fenilo o naftilo no sustituido o sustituido.

50 El grupo modificador R es un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido. En determinadas realizaciones, los grupos bencilo sustituidos pueden presentar la estructura siguiente:



5 en la que R₃ representa un grupo alquilo C₁-C₆ ramificado o no ramificado, más preferentemente un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o no ramificado, un grupo alcoxi o un grupo nitro. Preferentemente R₃ se encuentra unido en la posición para.

10 Los grupos modificadores preferentes según la presente invención se representan mediante las estructuras mostradas a continuación:



15 En general, la selección empírica de un grupo modificador adecuado particular a partir de la clase de compuestos indicada en la presente memoria puede llevarse a cabo rutinariamente por un experto en la materia, basándose en la presencia de las cuatro propiedades indicadas anteriormente. Preferentemente, la idoneidad de un grupo particular se determina empíricamente mediante la utilización de los cebadores con nucleótidos modificados en una reacción de amplificación de ARNm en comparación con una reacción de amplificación de ADN. La idoneidad de la modificación está indicada por la amplificación del molde de ARNm y por una falta de un retraso sustancial de amplificación detectable del molde de ADN correspondiente al utilizar un cebador modificado. La selectividad incrementada de la reacción se observa mediante la utilización de un cebador con la modificación de base, en comparación con una reacción idéntica con un cebador no modificado.

25 En otra realización, la presente invención es un método de amplificación selectiva de una diana de ARN mensajero (ARNm), que comprende una unión exón-exón, en presencia del ADN genómico contaminante correspondiente. El método comprende proporcionar una muestra, que posiblemente comprende el ARN mensajero diana, pero que también puede contener el ADN genómico correspondiente, a) hibridando un primer oligonucleótido con dicha diana

- de ARNm y llevando a cabo una síntesis de ADN dirigida por ARN utilizando por lo menos un enzima capaz de síntesis dirigida por ARN, en la que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o con un grupo bencilo sustituido, es por lo menos parcialmente complementaria a dicha diana de ARNm, y comprende una unión exón-exón en la diana, y b) amplificar el producto de la etapa a) utilizando dicho primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con por lo menos un enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN, en el que dicho segundo oligonucleótido es por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm.
- El método de la presente invención utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana de ácidos nucleicos. En particular, para amplificar una diana de ARNm, los métodos utilizan la reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, el método de la invención utiliza PCR "en tiempo real" o "cinética". Típicamente, se lleva a cabo una PCR cinética en presencia de por lo menos dos cebadores y una sonda oligonucleótida marcada para permitir la detección del producto amplificado durante la amplificación. En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de hibridación que emite una señal detectable tras la hibridación con la secuencia diana durante cada ciclo de amplificación. En otras realizaciones, la sonda es una sonda nucleasa que emite la señal tras la digestión con nucleasa 5'-3' de la sonda hibridada por la ADN polimerasa durante cada ciclo de amplificación.
- En algunas realizaciones, la reacción de RT-PCR implica un protocolo de inicio en caliente. En el contexto de la RT-PCR, la selectividad de los cebadores con respecto al ARN y el ADN correspondiente puede mejorarse mediante la utilización de un protocolo de inicio en caliente. Se conocen de la técnica muchos protocolos de inicio en caliente, por ejemplo la utilización de cera, que separa los reactivos críticos del resto de la mezcla de reacción (patente US nº 5.411.876), la utilización de una polimerasa de ácidos nucleicos inactivada reversiblemente por un anticuerpo (patente US nº 5.338.671), una polimerasa de ácidos nucleicos inactivada reversiblemente por un oligonucleótido que ha sido diseñado para unirse específicamente a su sitio activo (patente US nº 5.840.867) o la utilización de una polimerasa de ácidos nucleicos con modificaciones químicas reversibles, tal como se describe en, por ejemplo, las patentes US nº 5.677.152 y nº 5.773.528.
- En algunas realizaciones de la invención, el ensayo de RT-PCR incluye el ensayo de PCR en tiempo real. En un ensayo de PCR en tiempo real, la medida de la amplificación es el "ciclo umbral" o valor Ct. Un valor de Ct más temprano refleja que se ha alcanzado rápidamente el nivel umbral y, de esta manera, una amplificación más eficiente o una entrada inicial de molde más elevada del ácido nucleico diana. Un valor de Ct más tardío podría reflejar una amplificación ineficiente o inhibida o una entrada menor de ácido nucleico diana. En el contexto del ensayo de amplificación específico de ARN, el valor Ct más alto correspondiente a la diana de ADN es una medida de la discriminación entre las dianas de ARN y ADN o de la selectividad del ensayo.
- El ensayo de RT-PCR puede utilizar cualquier enzima termoestable incorporador de nucleótidos adecuado conocido de la técnica, así como enzimas no termoestables tales como, por ejemplo, RT de MMLV y RT de AMV. En ocasiones resulta deseable utilizar un enzima sin actividad correctora de errores (de exonucleasa 3'-5'), tal como, por ejemplo, ADN polimerasa Taq, tal como, por ejemplo, rTth o Z05. También puede resultar deseable utilizar enzimas, sustancialmente o completamente sin actividad de nucleasa 5'-3', tal como se describe en la patente US nº 5.795.762. Un ejemplo de dicho enzima es la polimerasa ΔZ05. En ocasiones resulta deseable disponer de un enzima con una capacidad de "inicio en caliente", tal como los enzimas modificados reversiblemente que se describen en las patentes US nº 5.677.152 y nº 5.773.528. Un ejemplo de un enzima de inicio en caliente es polimerasa ΔZ05-Gold. En algunas realizaciones, también puede utilizarse un enzima modificado con propiedades manipuladas deseables.
- La detección de los productos de amplificación puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica. Entre estos métodos se incluyen la utilización de cebadores y sondas marcados, así como diversos pigmentos de unión a ácidos nucleicos. Los medios de detección pueden ser específicos para una variante de la secuencia diana, o pueden ser genéricos para todas las variantes de la secuencia diana o incluso de todos los ADN de doble cadena. Los métodos de detección no específica pueden utilizarse en el caso de que la amplificación de las variantes no deseadas de la diana sea mínima y se espere que sea menor al límite de detección del método.
- Los productos de amplificación pueden detectarse tras completarse la amplificación, por ejemplo mediante electroforesis en gel de los productos no marcados y la tinción del gel con un pigmento de unión a ácidos nucleicos. Alternativamente, los productos de amplificación pueden portar un marcaje radioactivo o químico, en virtud de la incorporación durante la síntesis o en virtud de que los productos de extensión lo sean de un cebador marcado. Posteriormente, o durante la electroforesis, los productos de amplificación marcados pueden detectarse con herramientas radiológicas o químicas adecuadas conocidas de la técnica. Tras la electroforesis, el producto también puede detectarse con una sonda específica de diana marcada mediante cualquiera de los métodos conocidos de la técnica. La sonda marcada también puede aplicarse a la diana sin electroforesis, es decir, en un ensayo de

transferencia de puntos o similar.

En otras realizaciones, la presencia del producto de amplificación puede detectarse en un ensayo homogéneo, es decir, en un ensayo en el que el producto naciente se detecta durante los ciclos de amplificación, o por lo menos en el mismo tubo no abierto y en el que no resulta necesaria ninguna manipulación posterior a la amplificación. Se ha descrito un ensayo de amplificación homogénea en, por ejemplo, la patente US nº 5.210.015. El ensayo de amplificación homogénea utilizando pigmentos intercalantes de ácidos nucleicos se ha descrito en, por ejemplo, las patentes US nº 5.871.908 y nº 6.569.627. El ensayo homogéneo también puede utilizar sondas fluorescentes marcadas con dos fluoróforos interactuantes, tal como sondas de "baliza molecular" (Tyagi et al., Nat. Biotechnol. 14:303-308, 1996) o sondas de nucleasa marcadas fluorescentemente (Livak et al., PCR Meth. Appl. 4:357-362, 1995). En determinadas variaciones de estas tecnologías, también puede identificarse un producto de amplificación en virtud de su diferente temperatura de fusión, ver las patentes US nº 5.871.908 y 6.569.627.

En el caso de la amplificación homogénea, la diana se detecta utilizando una sonda oligonucleótida. La sonda se marca con un marcaje que facilita la determinación de la presencia o de la identidad de la diana. La sonda puede comprender una o más fracciones de marcaje, y opcionalmente una o más fracciones inhibitoras. La fracción de marcaje puede ser una detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

En algunas realizaciones, el marcaje es una fracción fluorescente. Entre los marcajes fluorescentes pueden incluirse pigmentos que se encuentran cargados negativamente, tales como pigmentos de la familia de la fluoresceína, o pigmentos que presentan una carga neutra, tales como pigmentos de la familia de la rodamina, o pigmentos que presentan una carga positiva, tales como pigmentos de la familia de la cianina. Entre otras familias de pigmentos que pueden utilizarse en la invención se incluyen, por ejemplo, los 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 escuarina, pigmentos quelados de la familia de los lantánidos, pigmentos ALEXA FLUOR® y de la familia BODIPY® (Molecular Probes, Inc., Eugene, Or.).

Además de los marcajes fluorescentes, las sondas pueden presentar una o más fracciones inhibitoras. Un inhibidor se refiere a una fracción química que absorbe la energía emitida por un pigmento fluorescente, o que de otra manera interfiere con la capacidad del pigmento fluorescente de emitir luz. Un inhibidor puede reemitir la energía absorbida de un pigmento fluorescente en una señal que es característica de ese inhibidor. Alternativamente, el inhibidor puede disipar la energía absorbida de un pigmento fluorescente en forma de calor. Entre los inhibidores no fluorescentes ejemplares se incluyen los Black Hole Quenchers™ comercializados por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Calif.), los Eclipse Dark Quenchers de Epoch Bioscientific (Bothell, Wash.) y los Iowa Black (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa).

Los marcajes e inhibidores pueden unirse a la sonda oligonucleótida directa o indirectamente mediante una diversidad de técnicas. Dependiendo del tipo exacto de marcaje utilizado, éste puede encontrarse situado en el extremo 5' ó 3' de la sonda, o encontrarse situado internamente en la secuencia de nucleótidos. Los marcajes e inhibidores pueden unirse directamente a un nucleótido, o pueden unirse indirectamente mediante conectores o espaciadores. La preparación de oligonucleótidos marcados a partir de reactivos disponibles comercialmente, tales como fosforamiditas, se describe en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, editado por Innis et al., Academic Press, Inc., 1990.

En otra realización, la invención proporciona una mezcla de reacción para amplificar específica o selectivamente ARNm en presencia del ADN genómico contaminante correspondiente, comprendiendo la mezcla por lo menos un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm y que comprende la unión exón-exón en la diana, en la que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido, y por lo menos un segundo oligonucleótido por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm. La mezcla de reacción puede comprender además uno o más enzimas capaces de síntesis de ADN dirigida por ARN o ADN. La mezcla de reacción puede comprender además los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo precursores de ácidos nucleicos, es decir, nucleósidos trifosfato, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para proporcionar soporte a la actividad de las enzimas presentes en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción puede comprender además el ADN genómico correspondiente. Todavía adicionalmente, la mezcla de reacción puede comprender reactivos necesarios para la detección de los ácidos nucleicos amplificados.

En otra realización, la invención proporciona un kit para amplificar específica o selectivamente ARNm en presencia del ADN genómico contaminante correspondiente, comprendiendo el kit por lo menos un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm y que comprende la unión exón-exón en la diana, en

5 el que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido, y por lo menos un segundo oligonucleótido por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm. El kit puede comprender además uno o más enzimas capaces de síntesis de ADN dirigida por ARN o ADN. El kit puede comprender además los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo precursores de ácidos nucleicos, es decir, nucleósidos trifosfato, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para proporcionar soporte a la actividad de los enzimas presentes en el kit. El kit puede incluir además una cantidad de ARNm diana. El kit puede incluir además una cantidad del ADN genómico correspondiente. Todavía adicionalmente, el kit puede incluir reactivos necesarios para la detección de los ácidos nucleicos amplificados. 10 Todavía adicionalmente, el kit puede incluir instrucciones para la práctica del método de la presente invención.

Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

15 Ejemplos

En los ejemplos siguientes, cada 50 µl de reacción contenían 10 ng, 100 ng ó 1 mg de ADN genómico humano, ó 10 ng ó 100 ng de ARN fpet como molde. En algunos experimentos, se utilizó un reactivo de control positivo que contenía una mezcla de transcritos de ARN in vitro como molde. Los diferentes moldes se describen en las tablas de resultados. Se agruparon reacciones separadas, cada una de las cuales contenía los diferentes cebadores inversos, con un cebador directo común y una sonda común. Cada reacción contenía 0,3 mM de cada cebador directo e inverso, 0,1 mM de sonda, acetato de manganeso 2,5 mM, tricina 50 mM, acetato potásico 150 mM, hidróxido potásico 13,4 mM, glicerol al 8%, DMSO al 1%, 200 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dUTP 400 mM, dTTP 50 mM, Hawk Z05 0,075 mM, 0,2 U/ml de polimerasa Z05, 0,04 U/ml de UNG, azida sódica al 0,018%, Tween-20 al 0,01% y EDTA 0,1 mM. 20 25

La transcripción inversa (RT) y la amplificación se llevaron a cabo utilizando el instrumento Roche LightCycler 480. Las reacciones se sometieron al perfil de temperaturas siguiente: 50°C durante 5 minutos (etapa de UNG), 95°C durante 1 minuto (activación de la polimerasa), 61°C durante 30 minutos (etapa de RT), seguido de 55 ciclos de 30 95°C durante 15 segundos y 61°C durante 30 segundos. Los datos de fluorescencia se recogieron al final de cada etapa de 61°C durante los últimos 53 ciclos, con el fin de generar curvas de crecimiento (no mostradas). Finalmente, las reacciones se enfriaron a 40°C durante 30 segundos.

Tabla 1: cebadores y sondes

35

oligonucleótido	SEC ID nº	función	secuencia
GB_ERBB2F1	1	Cebador directo	CAGTACCCCTGCCCTCTGAGX
RL_ERBB2_HEX_3	2	Sonda	ECCCCCTGQACCTGCAGCCCCCAP
GB_ERBB2R1	3	Cebador inverso	GAACATCTGGCTGGTTCACATATTCX
LS_ERBB2_R1	4	Cebador inverso	CATCTGGCTGGTTCACATATTCAG
LS_ERBB2_R2	5	Cebador inverso	CATCTGGCTGGTTCACATATTCAGG
LS_ERBB2_R3	6	Cebador inverso	CTGGCTGGTTCACATATTCAGGC
LS_ERBB2_R7	7	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTCAGGCT
LS_ERBB2_R8	8	Cebador inverso	GGCTGGTTCACATATTCAGGCTG
LS_ERBB2_R9	9	Cebador inverso	GCTGGTTCACATATTCAGGCTGG
LS_ERBB2_R10	10	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTCAGGY
LS_ERBB2_R12	11	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTYAGGY
LS_ERBB2_R13	12	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTCAGGC
LS_ERBB2_R14	13	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTYAGGC
LS_ERBB2_R15	14	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTCXGGC
LS_ERBB2_R16	15	Cebador inverso	TGGCTGGTTCACATATTCXGGY
E=cx-HEX Q=BHQ-2 P=Fosfato X = t-butyl-bencil-dA Y = t-butyl-bencil-dC			

Ejemplo 1

Amplificación novedosa de ADN genómico con cebadores específicos de ARNm

40

En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), el cebador inverso

(SEC ID nº 3) y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encontraban situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión de Exón 30 y Exón 31 del gen erbB2. El ácido nucleico de molde era ADN genómico humano obtenido de Roche (material nº 11691112001).

5 Se muestran los resultados en la Tabla 2 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. Los resultados demuestran que la estrategia de la técnica anterior de evitar la amplificación del ADN contaminante resulta inadecuada. El ADN genómico es fácilmente amplificado con el cebador inverso específico de ARNm que comprende una unión exón-exón.

10 Tabla 2: amplificación (Ct*) de ADN genómico con cebadores específicos de ARNm

SEC ID nº del cebador inverso	1 mg de ADN genómico	100 ng de ADN genómico
3	23,12 (0,14)	26,83 (0,27)
* Media de cinco experimentos (desviación estándar)		

Ejemplo 2

15 Mejora de la amplificación específica de ARN con cebadores específicos de ARNm que comprenden más bases complementarias al Exón 30

20 En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), un cebador inverso seleccionado de entre SEC ID nº 3-6 y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encontraban situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión del Exón 30 y el Exón 31 del gen erbB2 y comprendía más bases complementarias al Exón 30 que el cebador inverso con SEC ID nº 3. Los moldes utilizados eran ADN genómico humano, ADN aislado a partir de tejido fijado con formalida e incluido en parafina (FFPET) y ARN aislado a partir de FFPET. Se muestran los resultados en la Tabla 3 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. La diferencia de Ct entre el ARN y el molde de ADN es indicativa de una mayor especificidad del ensayo para el molde de ARN. El cebador inverso con SEC ID nº 6 mostró la mayor mejora de especificidad hacia el molde de ARN.

25 Tabla 3: amplificación (Ct*) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	10 ng de ADN genómico	10 ng de FFPET-ADN	10 ng de FFPET-ARN
3	30,75 (0,42)	38,25 (0,64)	27,16 (0,05)
4	27,65 (0,18)	34,85 (0,22)	26,76 (0,06)
5	29,77 (0,17)	36,19 (0,45)	26,71 (0,30)
6	37,74 (0,72)	36,23**	26,66 (0,16)
*Media de tres experimentos (desviación estándar)			
**Uno de cada tres experimentos proporcionó resultados detectables			

30 Ejemplo 3

35 Mejora adicional de la amplificación específica de ARN con cebadores específicos de ARNm que comprenden más bases complementarias al Exón 30

40 En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), un cebador inverso seleccionado de entre SEC ID nº 6-9 y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encontraban situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión de Exón 30 y Exón 31 del gen erbB2 y comprendía más bases complementarias al exón 30 que el cebador inverso con SEC ID nº 3. Los moldes utilizados eran ADN genómico humano, ARN aislado a partir de FFPET y un reactivo de control positivo que era una mezcla de transcritos de ARN que contenía 16 copias/ml de transcrito de ARN in vitro ERBB2 en la reacción.

45 Se muestran los resultados en las Tablas 4 y 5 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. La diferencia de Ct entre el ARN y el molde de ADN es indicativa de una mayor especificidad del ensayo para el molde de ARN, con un resultado ND (no detectable) que indica la nula amplificación del molde. El cebador inverso con SEC ID nº 7 mostró la mayor mejora de especificidad hacia el molde de ARN.

Tabla 4: amplificación (Ct*) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	100 ng de ADN genómico	10 ng de ADN genómico	ARN de control positivo
3	26,69 (0,05)	30,41 (0,19)	29,72 (0,20)
6	34,89 (0,19)	39,12 (2,04)	29,72 (0,20)
7	36,14**	ND	29,75 (0,04)
8	31,90 (0,07)	34,93 (0,65)	29,81 (0,10)
9	30,15 (0,03)	33,36 (0,51)	29,60 (0,07)
*Media de tres experimentos (desviación estándar) **Uno de cada tres experimentos proporcionó resultados detectables			

5

Tabla 5: amplificación (Ct) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	100 ng de ADN genómico*	100 ng de FFPET-ARN**
3	27,23* (0,20)	23,73 (0,13)
6	35,79 (0,47)	23,23 (0,30)
7	35,54 (0,70)***	23,16 (0,08)
*Media de seis experimentos (desviación estándar) **Media de tres experimentos (desviación estándar) *** Tres de cada seis experimentos proporcionaron resultados detectables.		

Ejemplo 4

10 Mejora de la amplificación específica de ARN con cebadores específicos de ARNm que comprendían modificaciones.

15 En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), un cebador inverso seleccionado de entre SEC ID nº 3-10 y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encuentran situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión de Exón 30 y Exón 31 del gen erbB2 y comprendía más bases complementarias al exón 30 que el cebador inverso con SEC ID nº 3. El cebador inverso con SEC ID nº 10 comprendía una modificación. Los moldes utilizados eran ADN genómico humano y un reactivo de control positivo que era una mezcla de transcritos de ARN que contenía 16 copias/ml de transcrito de ARN in vitro ERBB2 en la reacción.

20 Se muestran los resultados en la Tabla 6 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. La diferencia de Ct entre el ARN y el molde de ADN es indicativa de una mayor especificidad del ensayo para el molde de ARN, con un resultado ND (no detectable) que indica la nula amplificación del molde. El cebador inverso con SEC ID nº 10 comprendía una modificación y mostraba la mayor mejora de especificidad hacia el molde de ARN.

25

Tabla 6: Amplificación (Ct) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	100 ng de ADN genómico*	ARN de control positivo**
3	26,91(0,14)	30,24 (0,09)
7	34,43 (0,39)***	29,95 (0,03)
10	ND	30,39 (0,05)
* Media de seis experimentos (desviación estándar) ** Media de tres experimentos (desviación estándar) ***Tres de cada seis experimentos proporcionaron resultados detectables. Media de tres experimentos (desviación estándar)		

Ejemplo 5

30 Mejora de la amplificación específica de ARN con cebadores específicos de ARNm que comprendían una modificación.

En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), un cebador

inverso seleccionado de entre SEC ID nº 7-10 y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encuentran situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión de Exón 30 y Exón 31 del gen erbB2 y comprendía una modificación. Los moldes utilizados eran ADN genómico humano, ARN aislado a partir de FFPET y un reactivo de control positivo que era una mezcla de transcritos de ARN que contenía 16 copias/ml de transcrito de ARN in vitro ERBB2 en la reacción.

Se muestran los resultados en la Tabla 7 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. La diferencia de Ct entre el ARN y el molde de ADN es indicativa de una mayor especificidad del ensayo para el molde de ARN. El cebador inverso con SEC ID nº 10 comprendía una modificación y mostraba la mayor mejora de especificidad hacia el molde de ARN.

Tabla 7: amplificación (Ct*) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	1 mg de ADN genómico*	100 ng de FFPET-ARN**	ARN de control positivo**
7	33,08 (0,30)	22,97 (0,04)	29,94 (0,07)
10	42,43***	23,81 (0,17)	30,58 (0,19)
*Media de cinco experimentos (desviación estándar)			
**Media de tres experimentos (desviación estándar)			
***Uno de cada cinco experimentos proporcionó resultados detectables.			

Ejemplo 6

Mejora de la amplificación específica de ARN con cebadores específicos de ARNm que comprendían una modificación.

En el presente ejemplo, la amplificación de la diana erbB2 utilizó el cebador directo (SEC ID nº 1), un cebador inverso seleccionado de entre SEC ID nº 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 y la sonda de detección (SEC ID nº 2). El cebador directo y la sonda se encuentran situados en el Exón 30, mientras que el cebador inverso comprendía la unión de Exón 30 y Exón 31 del gen erbB2 y comprendía una modificación. Los moldes utilizados eran ADN genómico humano y ARN aislado a partir de FFPET. Se muestran los resultados en la Tabla 8 como valores de Ct para las reacciones de amplificación. La diferencia de Ct entre el ARN y el molde de ADN es indicativa de una mayor especificidad del ensayo para el molde de ARN. El cebador inverso con SEC ID nº 10 comprendía una modificación y mostraba la mayor mejora de especificidad hacia el molde de ARN. Los cebadores inversos con SEC ID nº 11 y SEC ID nº 15 también mostraban una mejora de la especificidad hacia el molde de ARN; sin embargo, los valores de Ct para el molde de ARN FFPET indicaban un retraso en comparación con los resultados obtenidos con la SEC ID nº 10.

Tabla 8: amplificación (Ct*) de los moldes de ARN y ADN

SEC ID nº del cebador inverso	100 ng de ADN genómico	100 ng de ARN FFPET
3	27,37 (0,29)	24,23 (0,07)
6	34,37 (0,28)	23,60 (0,12)
7	34,88 (0,24)	23,57 (0,01)
10	ND	24,23 (0,04)
11	ND	29,43 (0,05)
12	35,46 (0,84)	23,61 (0,03)
13	44,16 (5,43)**	24,60 (0,01)
14	40,92 (0,37)**	24,26 (0,10)
15	ND	30,04 (0,10)
*Media de tres experimentos (desviación estándar)		
**Dos de cada tres experimentos proporcionaron resultados detectables.		
Media de dos experimentos (desviación estándar)		

Curvas de amplificación para los cebadores SEC ID nº 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 pueden encontrarse en las figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, respectivamente.

Aunque la invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a ejemplos específicos, resultará evidente para el experto en la materia que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. De esta manera, el alcance de la invención no debería limitarse a ninguno de los ejemplos descritos en la presente memoria, sino según las reivindicaciones proporcionadas posteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

- 5 <120> AMPLIFICACIÓN PREFERENTE DE ARNm RESPECTO A ADN UTILIZANDO CEBADORES MODIFICADOS QUÍMICAMENTE
 <130> 26422 WO-KOE
- 10 <150> US 61/285,678
 <151> 2009-12-11
 <160> 15
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
- 25 <220>
 <221> modified_base
 <222> (21) .. (21)
 <223> t-butil-bencil-dA
- 30 <400> 1
 cagtaccct gcccttgag a 21
 <210> 2
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
- 40 <400> 2
 ccccctgacc tgcagcccc a 21
 <210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (26) .. (26)
 55 <223> t-butil-bencil-dA
 <400> 3
 gaacatctgg ctggtcaca tattca 26
- 60 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

5 <400> 4
 catctggctg gttcacatat tcag 24

10 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

15 <400> 5
 catctggctg gttcacatat tcagg 25

20 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

25 <400> 6
 ctggctggtt cacatattca ggc 23

30 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 7
 tggctggttc acatattcag gct 23

40 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

50 <400> 8
 ggctggttca catattcagg ctg 23

55 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

60 <400> 9
 gctggttcac atattcaggc tgg 23

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
 10
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (22) .. (22)
 <223> t-butil-bencil-dC
 15
 <400> 10
 tggctgggtc acatattcag gc 22
 <210> 11
 <211> 22
 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 25
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 11
 tggctgggtc acatattcag gc 22
 30
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
 <400> 12
 tggctgggtc acatattyag gc 22
 40
 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
 <220>
 50
 <221> modified_base
 <222> (18) .. (18)
 <223> t-butil-bencil-dC
 <400> 13
 55
 tggctgggtc acatattcag gc 22
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 60
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (19) .. (19)
<223> t-butyl-bencil-dA
5
<400> 14
tggctgggtc acatattcag gc 22
10
<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
20
<220>
<221> modified_base
<222> (19) .. (19)
<223> t-butyl-bencil-dA
25
<220>
<221> modified_base
<222> (22) .. (22)
<223> t-butyl-bencil-dC
30
<400> 15
tggctgggtc acatattcag gc 22

REIVINDICACIONES

1. Método de amplificación selectiva de un ARN mensajero diana, que comprende las etapas de:

5 a) hibridar un primer oligonucleótido con dicha diana de ARNm y llevar a cabo una síntesis de ADN dirigida por ARN utilizando por lo menos un enzima capaz de síntesis dirigida por ARN, en el que dicho primer oligonucleótido:

10 i. comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido,
 ii. es por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm, y
 iii. comprende una unión exón-exón en la diana,

15 b) amplificar el producto de la etapa a) utilizando dicho primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido con por lo menos un enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN, en el que dicho segundo oligonucleótido es por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm.

20 2. Método según la reivindicación 1, en el que la base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico del nucleótido se selecciona de entre el grupo que consiste de N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-terc-butil-bencil-adenina, N²-alquil-guanina, N⁴-bencil-citosina y N⁴-para-terc-butil-bencil-citosina.

25 3. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa c) de detección del producto de dicha síntesis de ADN dirigida por ARN y dirigida por ADN.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el enzima capaz de síntesis dirigida por ARN y el enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN son el mismo enzima.

30 5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho enzima o enzimas son polimerasas que presentan una actividad de nucleasa 5'-3' que es 50% o menos de la actividad de la ADN polimerasa Taq.

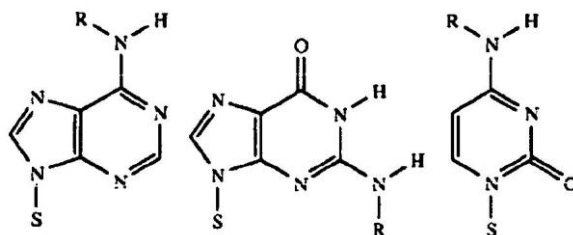
35 6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho enzima o enzimas se seleccionan de entre el grupo que consiste de ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Z05, ADN polimerasa delta-Z05 y ADN polimerasa delta-Z05-Gold o mutantes de las mismas.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer oligonucleótido se selecciona de entre un grupo que consiste de SEC ID n° 3, 10, 11, 13, 14 y 15.

40 8. Oligonucleótido para la amplificación selectiva de un ARN mensajero diana, que comprende una unión exón-exón, que comprende una secuencia de nucleótidos por lo menos parcialmente complementaria a dicho ARNm diana y que comprende la unión exón-exón en la diana y que además comprende por lo menos un nucleótido que presenta una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido.

45 9. Oligonucleótido según la reivindicación 8, en el que dicha base, modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico se selecciona de entre el grupo que consiste de N⁶-bencil-adenina, N⁶-para-terc-butil-bencil-adenina, N²-alquil-guanina, N⁴-bencil-citosina y N⁴-para-terc-butil-bencil-citosina.

50 10. Oligonucleótido según la reivindicación 8, en el que las estructuras de uno de dichos nucleótidos con una base modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico se selecciona de entre el grupo que consiste de:



en el que S representa una fracción sacárida y R representa un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido.

55

- 5 11. Mezcla de reacción para la amplificación selectiva de un ARN mensajero diana, que comprende una unión exón-exón, comprendiendo la mezcla por lo menos un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm y que comprende la unión exón-exón en la diana, en la que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido, y por lo menos un segundo oligonucleótido por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm.
- 10 12. Kit de amplificación selectiva de un ARN mensajero diana, que comprende una unión exón-exón, comprendiendo el kit: por lo menos un primer oligonucleótido, por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm y que comprende una unión exón-exón en la diana, en el que dicho primer oligonucleótido comprende por lo menos un nucleótido con una base adenina, guanina o citosina modificada covalentemente en el grupo amino exocíclico con un grupo bencilo o un grupo bencilo sustituido, y por lo menos un segundo oligonucleótido por lo menos parcialmente complementario a dicha diana de ARNm.
- 15 13. Kit según la reivindicación 12 ó la mezcla de reacción según la reivindicación 11, que comprende además uno o más enzimas capaces de síntesis de ADN dirigida por ARN o ADN.
- 20 14. Kit según la reivindicación 12 ó la mezcla de reacción según la reivindicación 11, que comprende además nucleósidos trifosfato e iones orgánicos e inorgánicos, adecuado para proporcionar soporte a la polimerización de ácidos nucleicos.
- 25 15. Kit según la reivindicación 12 ó la mezcla de reacción según la reivindicación 11, que comprende además reactivos necesarios para la detección de ácidos nucleicos.

FIGURA 1

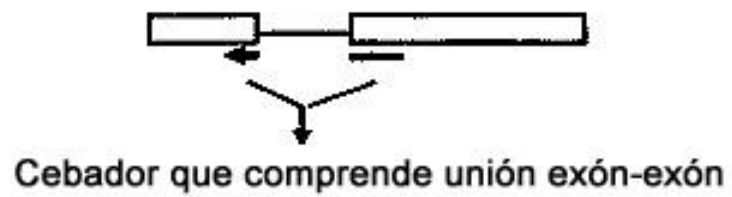


FIGURA 2

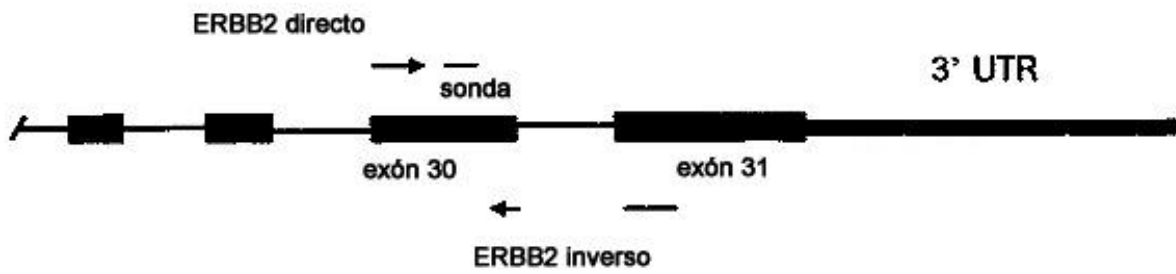


FIGURA 3

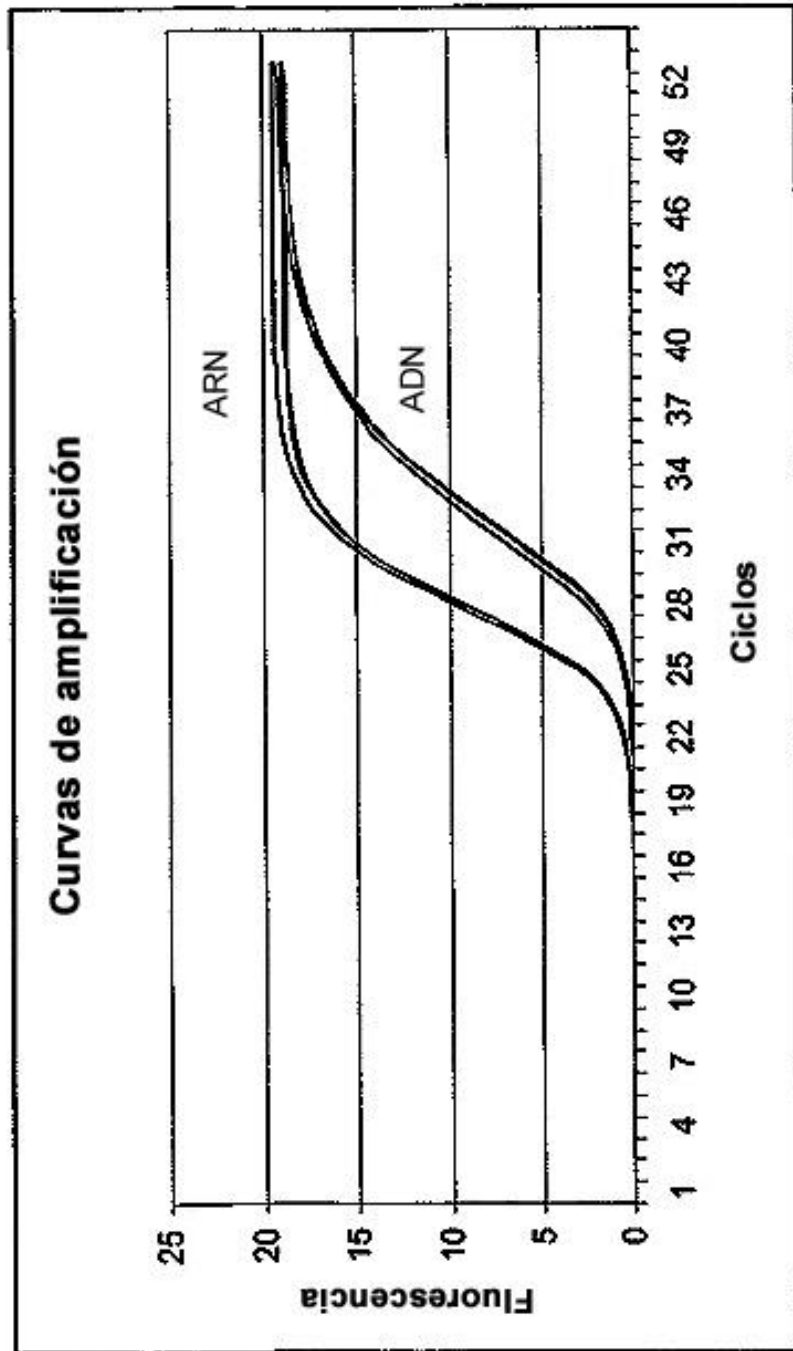


FIGURA 4

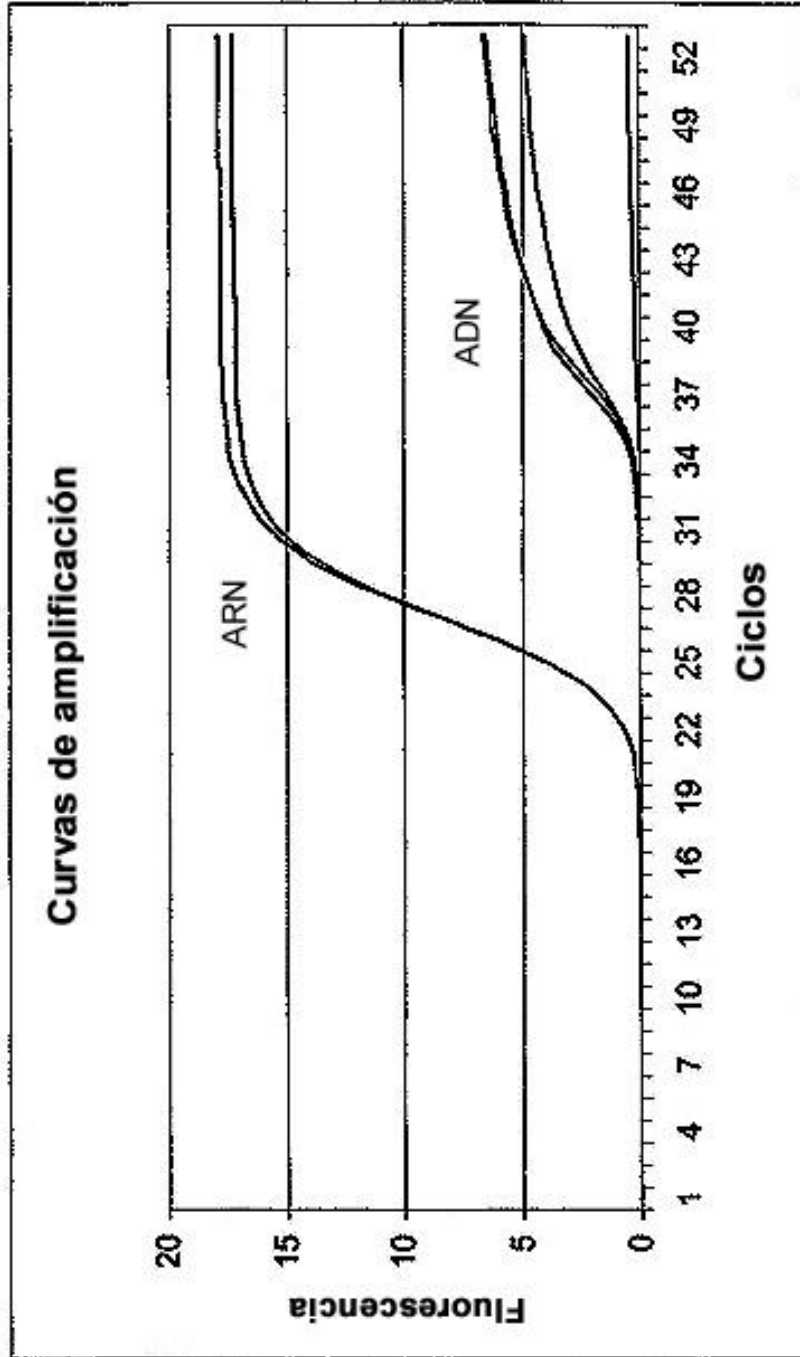


FIGURA 5

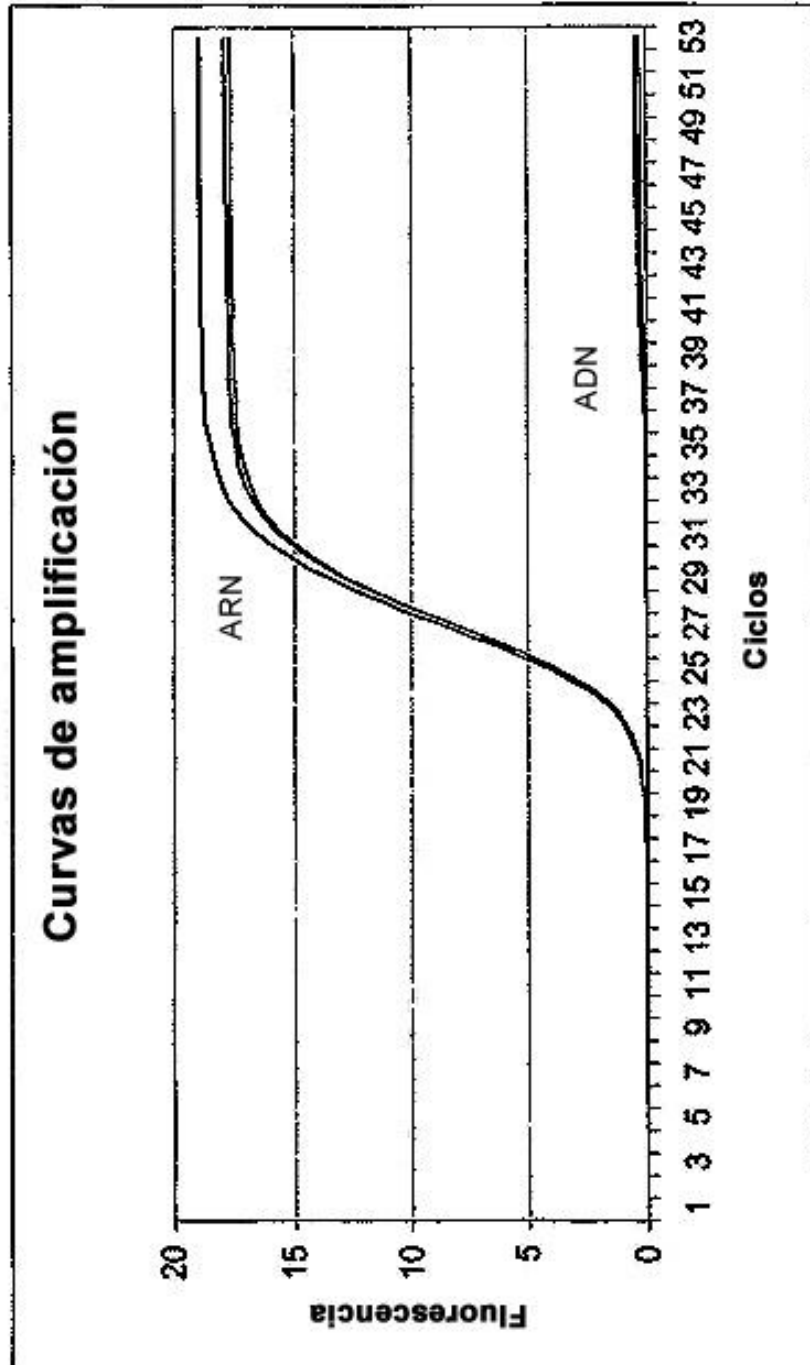


FIGURA 6

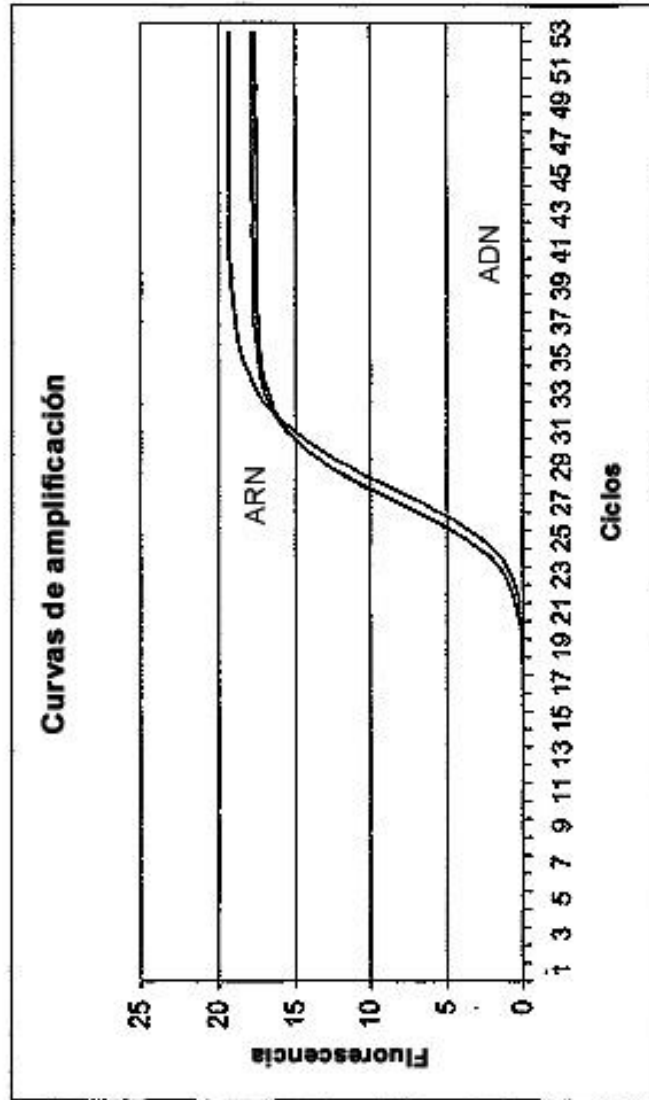


FIGURA 7

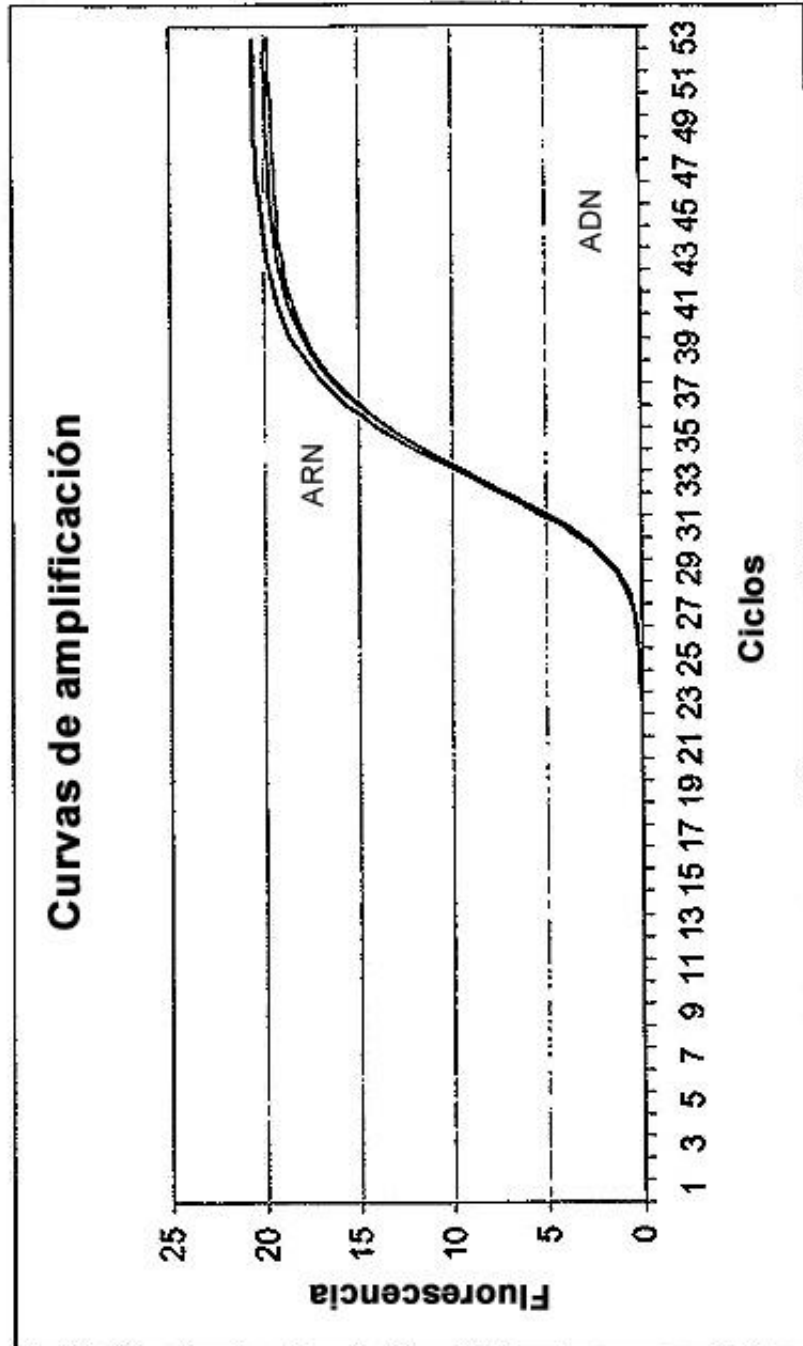


FIGURA 8

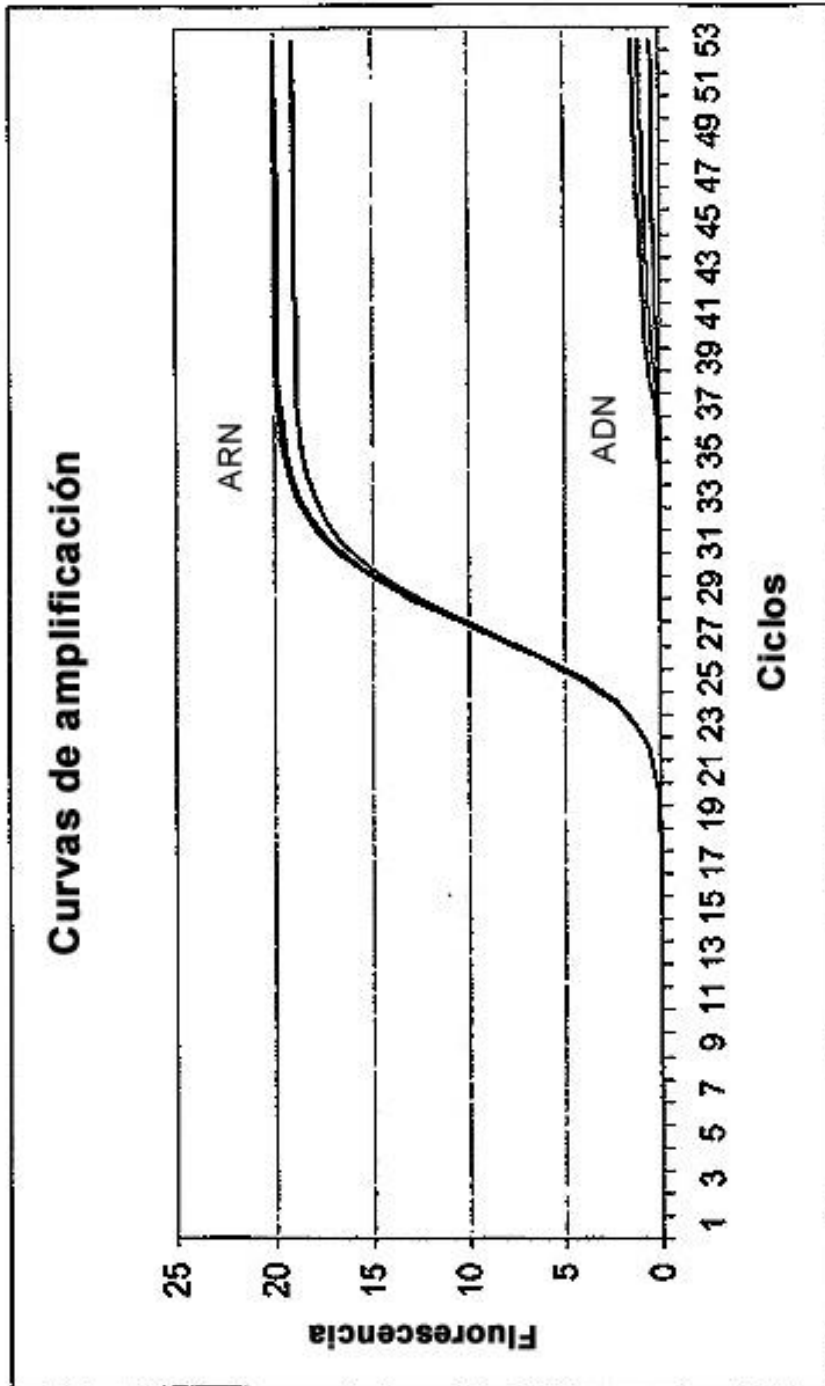


FIGURA 9

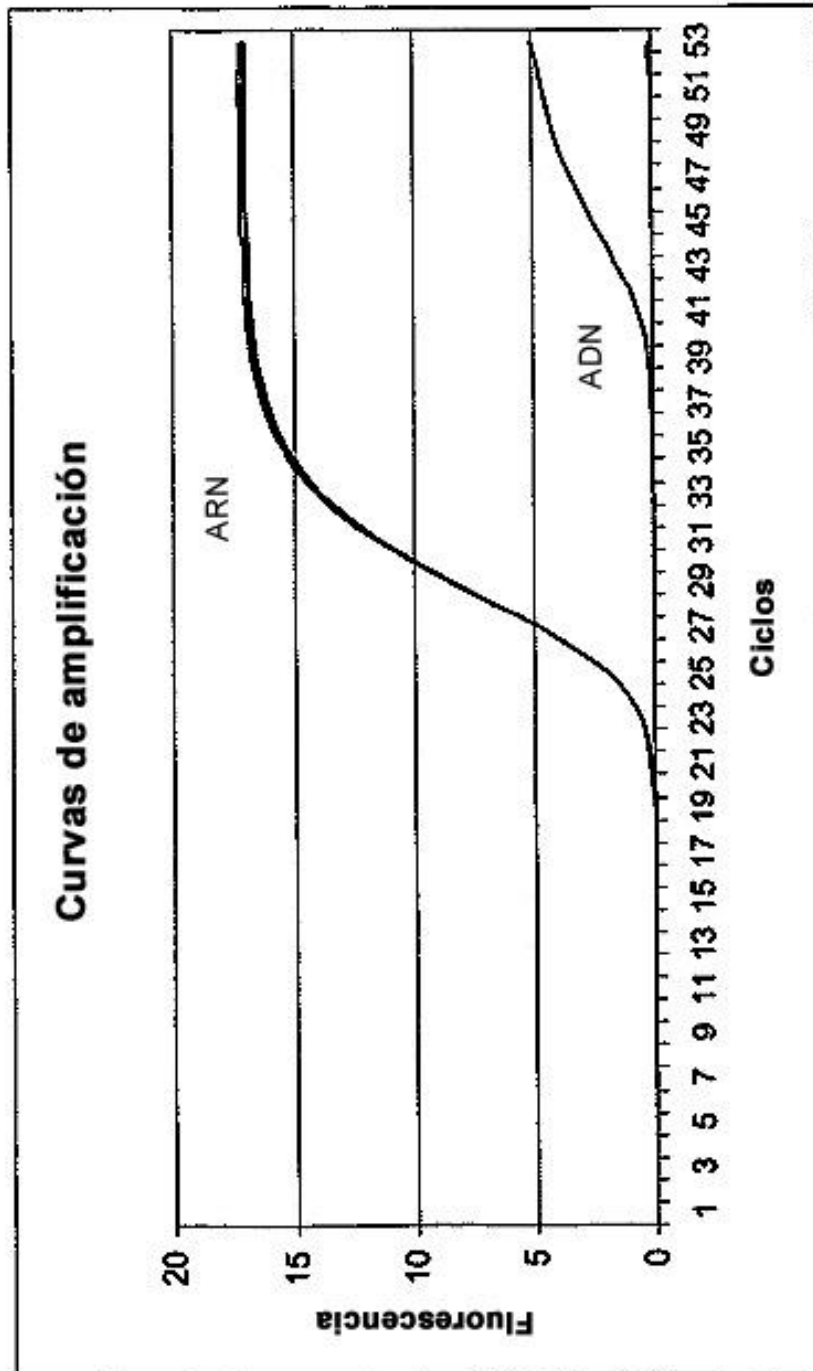


FIGURA 10

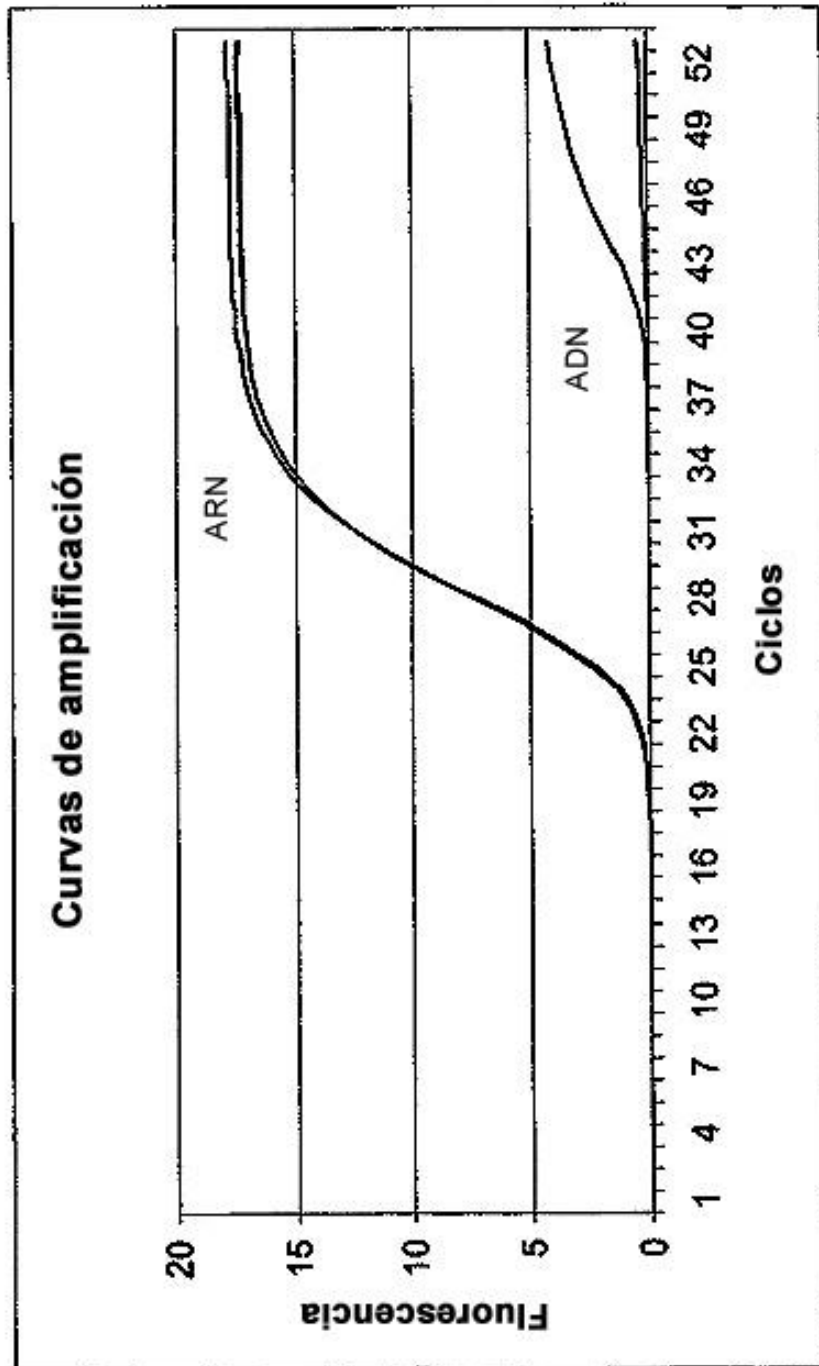


FIGURA 11

