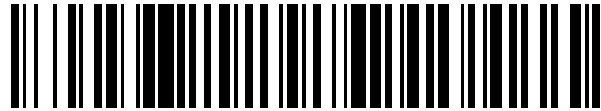


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 073**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 09003800 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2103693**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos en presencia de oligómeros aleatorios modificados**

30 Prioridad:

19.03.2008 EP 08005100

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

21.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HEINDL, DIETER;
ANKENBAUER, WALTRAUD y
LAUE, FRANK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 450 073 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 de ácidos nucleicos en presencia de oligómeros aleatorios modificados

5 La presente invención se refiere al campo de las reacciones de extensión de cebador catalizadas por polimerasa dependiente molde. En particular, la invención proporciona un nuevo método para la amplificación de ácidos nucleicos mediante la realización de una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Más concretamente, la presente invención proporciona un nuevo método para llevar a cabo una PCR de inicio en caliente en el aspecto de que se evita la amplificación de dímeros cebadores no específicos.

10 Antecedentes de la técnica

15 Un problema importante de la amplificación de ácidos nucleicos y más especialmente de la PCR es la generación de productos de amplificación no específicos. En muchos casos esto se debe a un cebado con oligonucleótidos no específicos y el suceso posterior de extensión del cebador antes del procedimiento de termociclado mismo, ya que las ADN polimerasas termoestables también son moderadamente activas a temperatura ambiente. Por ejemplo, los productos de amplificación debidos a la dimerización aleatoria de cebadores y su posterior extensión se observan con frecuencia. Con el fin de superar este problema, es bien conocido de la técnica llevar a cabo una PCR denominada "de inicio en caliente", en la que un componente esencial para la reacción de amplificación se separa de la mezcla de reacción o se mantiene en un estado inactivo hasta incrementar la temperatura de la mezcla de reacción por primera vez. Debido a que la polimerasa no puede funcionar bajo estas condiciones, no se produce alargamiento del cebador durante el periodo en que los cebadores pueden unirse de manera no específica. Para conseguir este efecto se han utilizado varios métodos:

25 a) la separación física de la ADN polimerasa.

La separación física puede obtenerse mediante, por ejemplo, una barrera de cera sólida, que separa el compartimiento que contiene la ADN polimerasa del compartimiento que contiene la masa principal de los demás reactivos. Durante la primera etapa de calentamiento la cera se funde automáticamente y se mezclan los compartimientos líquidos (Chou Q. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20:1717-23, 1992; patente US nº 5.411.876). Alternativamente, la ADN polimerasa se inmoviliza por afinidad sobre un soporte sólido antes de la reacción de amplificación y sólo se libera a la mezcla de reacción mediante una liberación mediada por calor (Nilsson J. *et al.*, *Biotechniques* 22:744-51, 1997). Sin embargo, ambos métodos resultan laboriosos y de realización incómoda.

35 b) Modificación química de la ADN polimerasa

Para este tipo de PCR de inicio en caliente, la ADN polimerasa se inactiva reversiblemente como resultado de una modificación química. Más concretamente, se introducen grupos de bloqueo termolábiles en la ADN polimerasa Taq, que dejan inactivo el enzima a temperatura ambiente (patente US nº 5.773.258). Estos grupos de bloqueo se eliminan a temperatura elevada durante una etapa previa a la PCR, de manera que el enzima se activa. Dicha modificación termolábil puede obtenerse, por ejemplo, mediante acoplamiento de anhídrido citracónico o anhídrido aconítrico con los residuos de lisina del enzima (patente US nº 5.677.152). Los enzimas que portan dichas modificaciones se encuentran disponibles comercialmente, como Amplitaq Gold (Moretti T. *et al.*, *Biotechniques* 25:716-22, 1998) o la ADN polimerasa FastStart (Roche Molecular Biochemicals). Sin embargo, la introducción de grupos de bloqueo es una reacción química que se produce arbitrariamente en todos los residuos de lisina estéricamente disponibles del enzima. Por lo tanto, la reproducibilidad y calidad de las preparaciones enzimáticas modificadas químicamente puede variar y resulta difícil de controlar.

50 b) Modificación por recombinación de la ADN polimerasa

Se preparan mutantes sensibles al frío de la polimerasa Taq mediante ingeniería genética. Estos mutantes difieren del enzima de tipo salvaje en que no presentan el extremo N-terminal (patente US nº 6.241.557). En contraste con la polimerasa Taq recombinante nativa o de tipo salvaje, estos mutantes son completamente inactivos a una temperatura inferior a 35°C y, de esta manera, pueden utilizarse en algunos casos para llevar a cabo una PCR de inicio en caliente. Sin embargo, la forma mutante sensible al frío con extremo N-terminal truncado requiere condiciones de tampón de baja concentración salina, presenta una procesividad inferior comparado con el enzima de tipo salvaje y, de esta manera, sólo puede utilizarse para la amplificación de ácidos nucleicos diana cortos. Además, debido a que la forma truncada no presenta actividad de exonucleasa 5'-3', no puede utilizarse para experimentos de PCR en tiempo real basados en el formato de detección TaqMan.

60 d) Inhibición de la ADN polimerasa por la adición de ácidos nucleicos

Se ha demostrado que la extensión de cebadores apareados no específicamente resulta inhibida por la inhibición de fragmentos cortos de ADN de doble cadena (Kainz P. *et al.*, *Biotechniques* 28:278-82, 2000). En este caso, la

extensión del cebador resulta inhibida a temperaturas inferiores al punto de fusión del fragmento corto de ADN de doble cadena, pero es independiente de la secuencia del ADN competidor mismo. Sin embargo, se desconoce en qué grado el exceso de ADN competidor influye sobre el rendimiento de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

5 Alternativamente, pueden utilizarse oligonucleótidos aptámeros con una secuencia específica que resulte en una estructura secundaria definida. Dichos aptámeros han sido seleccionados utilizando la tecnología SELEX para una afinidad muy elevada para la ADN polimerasa (patente US nº 5.693.502; Lin Y. y Jayasena S.D., J. Mol. Biol. 271:100-11, 1997). La presencia de dichos aptámeros en la mezcla de amplificación antes del procedimiento de termociclado mismo nuevamente resulta en una afinidad de unión elevada para la ADN polimerasa y en consecuencia en una inhibición termolábil de la actividad de la misma (patente US nº 6.020.130). Sin embargo, debido al procedimiento de selección, todos los aptámeros disponibles hasta el momento sólo pueden utilizarse en combinación con una especie particular de ADN polimerasa.

15 e) Anticuerpos de ADN Taq

Un enfoque alternativo para conseguir la inhibición termolábil de la ADN polimerasa Taq es la adición de anticuerpos monoclonales generados contra el enzima purificado (Kellogg D.E. *et al.*, Biotechniques 16:1134-7, 1994; Sharkey D.J. *et al.*, Biotechnology (NY) 12:506-9, 1994). Al igual que los oligonucleótidos aptámeros, el anticuerpo se une a la ADN polimerasa Taq con afinidad elevada a temperatura ambiente de manera inhibitoria (patente US nº 5.338.671). Se resuelve el complejo en una etapa de precalentamiento previa al procedimiento de termociclado mismo. Lo anterior conduce a una prolongación sustancial del tiempo de amplificación globalmente, especialmente en el caso de que se apliquen protocolos para el termociclado rápido (documento WO nº 97/46706).

25 La patente US nº 5.985.619 da a conocer una realización específica para llevar a cabo una PCR utilizando un anticuerpo de inicio en caliente, en la que aparte de la polimerasa Taq, se añade por ejemplo exonucleasa III de *E. coli* en forma de suplemento a la mezcla de amplificación con el fin de digerir los intermediarios dímeros de cebador no específicos. Tal como se ha dado a conocer anteriormente, la exonucleasa III reconoce el ADN de doble cadena como sustrato, tal como, por ejemplo, híbridos de diana/cebador o de diana/producto de extensión de cebador. La digestión tiene lugar mediante el corte del enlace fosfodiéster en el extremo 5' del residuo desoxinucleótido 3'-terminal. Debido a que este tipo de exonucleasa se encuentra activo a temperatura ambiente, todos los cebadores y productos de extensión de cebador apareados no específicamente resultan digeridos. Ello resulta, en algunas realizaciones, en una especificidad incrementada uniforme de la reacción de amplificación. Sin embargo, la digestión de los cebadores no específicos dependiente de la duración del tiempo de preincubación puede conducir a una reducción sustancial y no controlada de la concentración de cebador, que a su vez podría afectar a la reacción de amplificación misma.

35 f) Uso de cebadores modificados solos o en combinación con exonucleasas

40 Las patentes EP nº 0 799 888 y GB nº 2293238 dan a conocer una adición de oligonucleótidos 3'-bloqueados a las reacciones de PCR. Debido al bloqueo de 3', estos oligonucleótidos no pueden actuar como cebadores. Los oligonucleótidos bloqueados están diseñados para competir/interactuar con los cebadores de PCR, lo que resulta en la disminución de los productos no específicos.

45 Otra alternativa es la utilización de cebadores oligonucleótido fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de reacción de PCR (patente EP nº 0 744 470). En este caso, una exonucleasa 3', que habitualmente acepta sustratos de ADN tanto de doble cadena como de cadena sencilla, degrada los artefactos dúplex, tales como los dímeros cebadores, así como amplicones contaminantes anteriores, dejando sin degradar los cebadores de amplificación de cadena sencilla. De manera similar, se ha propuesto el uso de cebadores con un extremo 3' modificado básico y la eliminación dependiente de molde por parte de la endonucleasa IV de *E. coli* (patente US nº 5.792.607).

50 Una realización particular de la idea general se proporciona en la patente EP nº 1 275 735. Esta memoria da a conocer una composición para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende: (i) una ADN polimerasa termoestable, (ii) una exonucleasa 3'-5' termoestable, e (iii) por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3'-terminal modificado que no resulta alargado por dicha ADN polimerasa termoestable, así como métodos para llevar a cabo una reacción de PCR utilizando dicha composición.

60 Sin embargo, es una desventaja importante de las alternativas dadas a conocer que para cada reacción de PCR resultan necesarios cebadores modificados, lo que conduce a mayores necesidades y a un incremento del coste de cada ensayo individual.

g) otros aditivos de PCR

5 Otros aditivos orgánicos conocidos de la técnica, tales como DMSO, betainas y formamidas (documento WO nº 99/46400; Hengen P.N., Trends Biochem. Sci. 22:225-6, 1997; Chakrabarti R. y Schutt C.E., Nucleic Acids Res. 29:2377-81, 2001, resultan en una mejora de la amplificación de las secuencias ricas en GC, y no en la prevención de la formación de dímeros de cebadores. De manera similar, la heparina puede estimular la transcripción *in vitro* iniciada ("run on") presumiblemente mediante la eliminación de proteínas como las histonas con el fin de que el ADN cromosómico resulte accesible (Hildebrand C.E. *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta 477:295-311, 1977).

10 También es conocido que la adición de proteína de unión de cadena sencilla (patente US nº 5.449.603) o ARNt (Sturzenbaum S.R., Biotechniques 27:50-2, 1999) resulta en la asociación no covalente de estos aditivos con los cebadores. Esta asociación se rompe durante el calentamiento en la PCR. También se ha encontrado que la adición de ADN helicasas evita el apareamiento aleatorio de cebadores (Kaboev O.K. *et al.*, Bioorg. Khim. 25:398-400, 1999). Además, el poliglutamato (documento WO nº 00/68411) en varios casos puede utilizarse para inhibir la actividad de polimerasa a temperaturas bajas.

15 Además, es conocido que los inhibidores polianiónicos de polimerasa pueden controlar la actividad de las ADN polimerasas termoestables según la temperatura de incubación aplicada. La patente US nº 6.667.165 da a conocer una realización de inicio en caliente, caracterizada porque los complejos de polimerasa inactiva-inhibidor se forman a temperaturas inferiores a 40°C. Entre 40°C y 55°C, el inhibidor compite con el ADN molde para la unión a la polimerasa Taq, mientras que a temperaturas superiores a 55°C, el inhibidor resulta desplazado del sitio activo de la polimerasa. Sin embargo, el inhibidor tiende a reducir el rendimiento de producto obtenible al utilizar cebadores con temperaturas de hibridación más bajas.

20 La patente GB nº 2293238 se refiere a la reducción del cebador no específico durante la replicación y/o la amplificación mediante la adición a la reacción de oligonucleótidos aleatorios bloqueantes con ddNTP en el extremo 3', lo que reduce el cebado incorrecto de cebadores con cualquier región molde que no se encuentre estrechamente relacionada con la secuencia de interés.

25 h) Secuestro de magnesio

30 Debido a que es conocido desde hace mucho tiempo que las polimerasas termoestables son activas únicamente en presencia de cationes Mg^{2+} , se ha intentado el secuestro del magnesio antes del inicio del protocolo de termociclado para evitar el cebador incorrecto y la extensión de cebadores no específicos. Tal como se da a conocer en la patente US nº 6.403.341, el Mg^{2+} puede encontrarse presente en forma de precipitado y de esta manera no encontrarse disponible al inicio de la reacción de amplificación. Con el incremento de la temperatura durante la primera ronda de termociclado, el precipitado se disuelve y el Mg^{2+} se encuentra plenamente disponible en los primeros 3 ciclos. Se ha demostrado que dicha solución resulta aplicable y capaz de proporcionar buenos resultados de inicio en caliente. Por otra parte, dicha solución no permite la preparación de mezclas maestras que contengan todos los reactivos excepto los ácidos nucleicos cebador y diana, los cuales resultan necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. En consecuencia, la reproducibilidad entre ensayos de los datos y las comparaciones de datos resultan complicadas.

45 En vista de la técnica anterior descrita de manera general, es un objetivo de la invención proporcionar una composición y método alternativos mejorados para la PCR de inicio en caliente que permitan la inhibición del cebado y extensión de cebador no específicos no sólo antes del procedimiento de amplificación mismo sino también durante el procedimiento de termociclado. Más concretamente, es un objetivo de la invención proporcionar una composición y método alternativos para la PCR de inicio en caliente, en la que no pueda tener lugar extensión de cebadores apareados no específicamente.

50 Breve descripción de la invención

De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:

- una ADN polimerasa termoestable,
- desoxinucleótidos,
- 55 - una pareja de cebadores de amplificación, y
- un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica. Dicha modificación se sitúa en el extremo 5' de dicho oligonucleótido aleatorizado. Dicha fracción orgánica hidrofóbica de dicha modificación es un pireno o un estilbeno.

60 Dicha composición resulta particularmente útil para la realización de una reacción de amplificación por PCR debido a que se evita la formación de productos de amplificación artificiales, tales como dímeros cebadores.

Además, también se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente comprenda además una muestra de ácidos nucleicos diana.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende una ADN polimerasa termoestable y un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica. Dicha modificación se sitúa en el extremo 5' de dicho oligonucleótido aleatorizado (oligómero aleatorio con extremo protegido). Dicha fracción orgánica hidrofóbica de dicha modificación es un pireno o un estilbeno.

10 En una realización específica, dicho kit puede comprender no sólo un cebador, sino por lo menos una pareja de cebadores de amplificación.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para la extensión de cebadores en un ácido nucleico diana específico, que comprende las etapas de:

- 15
- proporcionar una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana,
 - añadir una composición tal como se ha dado a conocer anteriormente, y
 - realizar una reacción de amplificación por PCR.

20 Preferentemente, dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción en cadena de la polimerasa que se sigue en tiempo real. En una realización particular, el producto de amplificación generado en dicha amplificación se somete posteriormente a un análisis de la curva de fusión.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona una solución nueva y mejorada para llevar a cabo una reacción de extensión de cebador de especificidad incrementada. En particular, la presente invención proporciona una solución nueva y mejorada para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos de especificidad incrementada. El efecto denominado de inicio en caliente resulta en la inhibición eficaz de las elongaciones de cebador no deseadas. Las elongaciones de cebador no deseadas resultan de sucesos de hibridación accidentales en los que los

30 cebadores se hibridan por lo menos parcialmente con cualquier secuencia en una muestra de ácidos nucleicos que es diferente del sitio de unión del cebador en el ácido nucleico diana.

Se describen composiciones que comprenden:

- una ADN polimerasa,
- desoxinucleótidos,
- una pareja de cebadores de amplificación, y
- un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica en el extremo 5' que es un pireno o un estilbeno.

35 La ADN polimerasa en general puede ser cualquier enzima que sea capaz de llevar a cabo una reacción de extensión de cebador dependiente del molde. Dicha reacción de extensión de cebador dependiente del molde puede producirse en todos los híbridos de ácidos nucleicos parcialmente de doble cadena, caracterizada porque un ácido nucleico cebador con un grupo hidroxilo 3' libre se hibrida con un ácido nucleico molde con una protuberancia 5' de cadena sencilla. A continuación, la polimerasa dependiente de molde cataliza la extensión del extremo 3' del

40 cebador mediante la incorporación de residuos nucleótidos que en todos los casos son complementarios del nucleótido en la posición opuesta en la cadena molde. La reacción utiliza los dNTP como sustratos y resulta en la liberación de pirofosfato.

En una realización, dicha ADN polimerasa es una polimerasa dependiente de molde de ARN o cualquier modificación de la misma. Dichos enzimas habitualmente se denominan transcriptasas inversas. Son ejemplos la

45 transcriptasa inversa de AMV o la transcriptasa inversa MMLV. En particular la transcriptasa inversa Transcriptor (Roche Applied Science, nº de cat. nº 03 531 317 001) es un enzima aplicable en el contexto de la presente invención. Las composiciones de la invención que comprenden dicha ADN polimerasa dependiente de ARN resultan especialmente útiles para todos los tipos y aplicaciones de síntesis preparativas y analíticas de ADNc, y en particular para la RT-PCR de 2 etapas.

50 En otra realización, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa dependiente de molde de ADN o cualquier mutante o modificación de la misma. Un ejemplo destacado es la polimerasa Klenow (Roche Applied Science, nº de cat. 11 008 404 001). Preferentemente, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable o cualquier mutante o modificación de la misma. Un ejemplo típico es la ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus* (Roche Applied

55 Science, nº de cat. nº 11 647 679 001). Los enzimas ADN polimerasas dependientes de ADN pueden presentar o no una actividad correctora 3'-5', tal como la polimerasa Pwo (Roche Applied Science, nº de cat. nº 11 644 947 001). Además, el componente ADN polimerasa de la presente invención puede ser una mezcla de enzimas con y sin actividad correctora, tal como el sistema Expand High Fidelity (Roche Applied Science, nº de cat. nº 11 732 641

001). Las composiciones de la invención que comprenden cualquier tipo de polimerasa termoestable resultan especialmente útiles para llevar a cabo diversas realizaciones preparativas o analíticas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 En una realización adicional, el componente ADN polimerasa de la presente invención es una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable con actividad adicional de transcriptasa inversa dependiente de molde de ARN, tal como la polimerasa de *Thermus thermophilus* (Roche Applied Science, nº de cat. nº 11 480 014 001) o una mezcla de una ADN polimerasa dependiente de ARN (es decir, una transcriptasa inversa) y una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable. Las composiciones de la invención que comprenden dichos componentes
10 resultan particularmente útiles para el rendimiento analítico de la RT-PCR de una etapa.

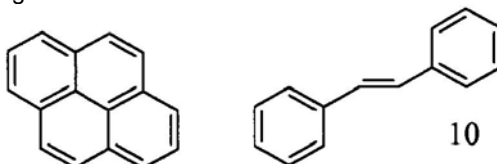
Los desoxinucleótidos-trifosfato (dNTP) habitualmente son una mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, sin embargo en algunos casos específicos, pueden utilizarse 3 ó menos tipos diferentes de dNTP. Además, dicho dNTP puede modificarse químicamente de cualquier manera, con la condición de que dicho bloque constructivo todavía sea capaz de ser incorporado en la cadena polinucleótida naciente por parte de la polimerasa. Por ejemplo, dichos
15 compuestos de nucleótidos modificados pueden portar una modificación de biotina o compuesto fluorescente en la fracción de bases respectiva.

El oligonucleótido u oligonucleótidos cebadores habitualmente son desoxi-oligonucleótidos completamente, o prácticamente por completo, complementarios a una región específica del ácido nucleico diana. Además, dicha fracción cebador debe presentar un grupo 3'-hidroxilo libre de manera que sea extensible por una ADN polimerasa. Con fines específicos, dicho cebador puede modificarse químicamente, por ejemplo en su extremo 3'. Son ejemplos de modificaciones utilizadas frecuentemente los marcajes de biotina, los marcajes de digoxigenina y los marcajes fluorescentes.
20

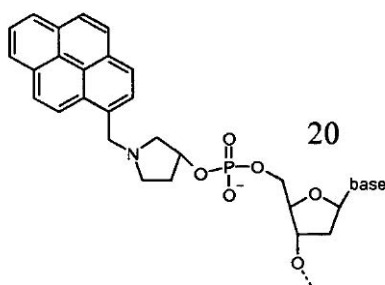
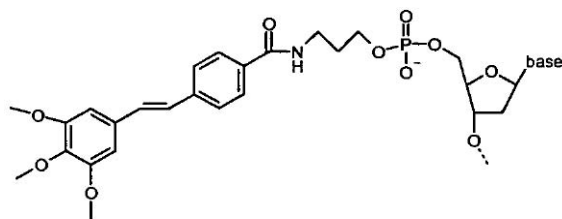
En el caso de que se diseñe una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable para una reacción de PCR, una composición según la presente invención comprende habitualmente dos oligonucleótidos cebadores que se hibridan, en orientaciones opuestas a las cadenas opuestas del ácido nucleico diana situado contiguamente a la secuencia diana que resultará amplificada. También resulta posible que una composición de la presente invención
25 comprenda múltiples parejas de cebadores oligonucleótidos de PCR para la amplificación por PCR multiplex.

El compuesto importante que discrimina una composición según la presente invención de las composiciones que se utilizan actualmente en la técnica es un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado añadido, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con un pireno o un estilbena. Más concretamente, la expresión "oligonucleótido aleatorizado" se refiere a un grupo de oligonucleótidos, las secuencias de los cuales representan más o menos igualmente todas las posibles combinaciones de los 4 residuos nucleótidos diferentes. Aunque la adición de 5-meros, así como la adición de 8-meros, se ha demostrado que presenta el efecto deseado de inicio en caliente, se ha encontrado inesperadamente que resulta particularmente ventajoso utilizar oligonucleótidos hexámeros aleatorizados. Dichos oligonucleótidos aleatorizados pueden añadirse a la reacción de extensión de cebador o a la reacción de PCR en un intervalo de concentraciones de entre 10 μM y 1 μM , preferentemente de entre 25 μM y 400 μM , y más preferentemente en una concentración de aproximadamente 100 mM. También se ha demostrado que resulta particularmente ventajoso que los oligonucleótidos aleatorizados presenten un extremo 3' no extensible, que por ejemplo puede bloquearse con una fracción fosfato. Ello evita una elongación no deseada por parte de la polimerasa en caso de una hibridación accidental de cualquiera de los oligonucleótidos en cualquiera región del ácido nucleico de la muestra.
35
40
45

La fracción hidrofóbica orgánica es un pireno sustituido opcionalmente o un estilbena sustituido opcionalmente, que presenta las estructuras químicas siguientes:



Más preferentemente, dicho pireno o estilbena se une al extremo 5' de un oligonucleótido aleatorizado, mientras que el extremo 5' de dicho oligonucleótido presenta la estructura siguiente:
50



Dicha fracción orgánica hidrofóbica se sitúa en el extremo 5' del oligonucleótido aleatorizado. El motivo es que dicha modificación en 5' puede introducirse en el oligonucleótido utilizando química de fosforamidita con una fosforamidita terminal apropiada según métodos estándares que son bien conocidos de la técnica y que las fosforamiditas pireno y estileno se encuentran disponibles comercialmente.

El oligonucleótido aleatorizado podría comprender análogos de nucleobase con bases modificadas tales como análogos 7-deaza tales como 7-deaza-dG, análogos 7-deaza-8aza tales como 7-bromo-7-deaza-8-aza-2-amino-dA o bases sustituidas tales como propinil-U, propinil-C, o análogos con azúcares modificados tales como 2'-metoxi-ribosa o azúcares bloqueados tales como LNA, o con análogos de ribosa tales como hexitol y altritol. En lugar de la aleatorización se utilizan bases universales tales como nitroindol o N8-ribosilado-7-deaza-8-aza-dA, mientras que preferentemente se utiliza en una posición de oligómero aleatorio una base universal en lugar de oligómeros aleatorios. El fosfato internucleósido podría sustituirse con un mimético de fosfato tal como fosforotioato o metilfosfonato o fosforamidatos. El oligonucleótido aleatorizado preferentemente presenta una fracción hidrofóbica pero puede sustituirse adicionalmente con otras fracciones hidrofóbicas, mientras que las fracciones hidrofóbicas se seleccionan independientemente unas de otras.

Las composiciones que comprenden oligonucleótidos aleatorizados que se encuentran químicamente modificados con una fracción orgánica hidrofóbica conjuntamente con una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable y por lo menos una pareja de cebadores de amplificación resultan particularmente útiles para la realización de una reacción de amplificación por PCR. El motivo de ello es que la presencia de dichos oligonucleótidos aleatorizados y modificados inhibe eficientemente la formación de productos de amplificación artificiales, tales como dímeros cebadores a temperaturas inferiores a las temperaturas de hibridación de los cebadores de amplificación respectivos, creando de esta manera un efecto de inicio en caliente.

También se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente comprenda además una muestra de ácidos nucleicos diana. La muestra habitualmente puede contener, por ejemplo, ADN genómico o ADN genómico fragmentado conjuntamente con ADN polimerasas dependientes de ADN o ARN celular total o ARN poli-A+ conjuntamente con ADN polimerasas dependientes de ARN.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona además kits para preparar composiciones tales como las dadas a conocer en detalle anteriormente. De esta manera, la presente invención se refiere además a un kit que comprende una ADN polimerasa termoestable y un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica. Dicha modificación es pireno o estileno y se sitúa en el extremo 5' de dicho oligonucleótido aleatorizado. Además, los kits pueden comprender componentes adicionales, tales como desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y tampones apropiados, así como otros aditivos reactivos, los cuales resultan útiles para llevar a cabo las reacciones respectivas de extensión de cebador. Además, los kits de parámetro específico pueden comprender por lo menos un oligonucleótido cebador específico de diana.

Se da a conocer además un kit diseñado para la síntesis de ADNc y que comprende una transcriptasa inversa tal como se ha dado a conocer anteriormente. Como componente cebador, el kit puede comprender un cebador de parámetro específico para la amplificación de ADNc específicos.

5 El kit está diseñado para llevar a cabo PCR y comprende una polimerasa termoestable dependiente de ADN o una mezcla de polimerasas termoestables dependientes de ADN. El kit puede comprender adicionalmente, por ejemplo, dNTP y/o una solución tampón y/o por lo menos una o múltiples parejas de cebadores de amplificación. Más concretamente, en el caso de que el kit se diseñe para una RT-PCR de una etapa, el componente enzima puede ser una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN que, además, comprenda actividad de transcriptasa inversa.

10 En una tercera realización específica, el kit está diseñado para RT-PCR de 2 etapas y puede comprender diversas combinaciones de componentes seleccionados de entre los componentes de la primera y segunda realizaciones dadas a conocer anteriormente.

15 Además, los kits según la segunda y tercera realizaciones específicas pueden comprender componentes que resultan útiles para la detección de productos de amplificación por PCR. Por ejemplo, en el caso de que el kit se diseñe para PCR en tiempo real (=PCRq), dicho kit puede comprender además un componente pigmento de unión a ADN de doble cadena tal como SybrGreen (Roche Applied Science, nº de cat. 04 707 516 001) o el pigmento ResoLight LC480 (Roche Applied Science, nº de cat. 04 909 640 001). Alternativamente, dicho kit puede comprender además sondas de hibridación marcadas fluorescentemente, tales como sondas TaqMan (patente US nº 5.804.375), Molecular Beacons (patente US nº 5.118.801), sondas de hibridación FRET (patente US nº 6.174.670) o Simple Probes (documento WO nº 02/14555).

25 Se dan a conocer no sólo composiciones y kits, sino también métodos para llevar a cabo reacciones de extensión de cebador en general y reacciones de PCR o de transcripción inversa, en particular. De esta manera, en su sentido más amplio, un método dado a conocer en la presente memoria comprende las etapas de: - proporcionar una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana,
- añadir cualquiera de las composiciones dadas a conocer anteriormente, y
- realizar por lo menos una primera reacción de extensión de cebador.

30 Más exactamente, un método según la presente exposición comprende las etapas de:
- proporcionar una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana,
- añadir:
35 - una ADN polimerasa,
- desoxinucleótidos,
- por lo menos un oligonucleótido cebador, y
- un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado por una fracción orgánica hidrofóbica.
- realizar por lo menos una primera reacción de extensión de cebador,

40 En una primera realización, la muestra es de ARN total o poli-A+, la ADN polimerasa es una transcriptasa inversa y el oligonucleótido cebador es un cebador específico que es complementario a un tipo específico de ADNc.

45 En una segunda realización, la muestra se deriva de ADN genómico, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable o una mezcla de ADN polimerasas termoestables y se añade por lo menos una pareja o múltiples parejas de cebadores de amplificación antes de una reacción de amplificación por PCR. Preferentemente, dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción en cadena de la polimerasa que se sigue en tiempo real según métodos estándares conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.210.015, nº 5.338.848, nº 5.487.972 y documentos WO nº 97/46707, nº 97/46712 y nº 97/46714).

50 En una realización particular, el producto de amplificación generado se somete a un análisis de curvas de fusión (patentes US nº 6.174.670 y nº 6.569.627) sometiendo el producto de amplificación a un gradiente térmico durante el tiempo. En este tipo de experimento, se realiza un seguimiento de la intensidad de fluorescencia, que se debe a la unión de una sonda de hibridación respectivamente marcada, o debido a la fluorescencia originada de un pigmento de unión al ADN. A continuación, la primera derivada de la reducción de la intensidad de fluorescencia debida a la
55 fusión de la sonda de hibridación o de las dos cadenas del amplicón, respectivamente, se representa en un gráfico frente al gradiente térmico. Tal como se muestra en los ejemplos, la presencia de un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica durante el procedimiento de amplificación proporciona posteriormente resultados de calidad superior de la curva de fusión.

60 En resumen, puede afirmarse que el método de la invención comprende varias ventajas respecto a métodos ya dados a conocer en la técnica. La presencia de un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción pireno o estilbena durante una reacción de

extensión de cebadores, tal como una transcripción inversa o una PCR o una RT-PCR, resulta claramente en un incremento de la especificidad de la reacción respectiva.

5 Hasta el momento, los inventores no entienden por completo el motivo o motivos para este efecto positivo. Una explicación mecanística posible podría ser que a temperaturas bajas una parte de la población aleatorizada de moléculas oligonucleótidas puede interactuar con el cebador en un grado en que el cebador no es capaz de ser elongado aunque ya se encuentre hibridado con una molécula de ácidos nucleicos más larga sustancialmente complementaria.

10 Una ventaja importante de la presente invención es la facilidad de utilización y el corto tiempo de activación para eliminar la inhibición de la polimerasa a temperaturas bajas. En términos simples resulta necesario añadir un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica, al diseño de una reacción de PCR. Durante el termociclado de PCR, el tiempo de desnaturalización previo al primer ciclo, habitualmente necesario para separar los moldes de ADN de doble cadena en cadenas sencillas, resulta suficiente para eliminar la interacción entre los oligómeros aleatorios conjugados y los cebadores de la PCR.

15 Además, los hexámeros aleatorios pueden sintetizarse según métodos estándares de química del fosforamidato, los cuales se encuentran bien establecidos en la técnica. Además, también pueden introducirse muy fácilmente modificaciones 5' en el oligonucleótido utilizando química del fosforamidato con un fosforamidato terminal respectivamente modificado según métodos estándares. De esta manera, los costes de producción del aditivo de PCR de la invención son bastante bajos en comparación con otras soluciones de inicio en caliente.

20 Además, los métodos, composiciones y kits de la invención pueden utilizarse genéricamente para cualquier tipo de extensión de cebador, transcripción inversa o amplificación por PCR, con independencia de qué secuencia específica de ácido nucleico diana se prepare, amplifique, detecte o analice.

Breve descripción de las figuras

30 Figura 1 Amplificación de ADN genómico en presencia de hexámeros terminados en pireno según el Ejemplo 1.

- Carril 1: PCR sin aditivo, 50 ng de ADN
- Carril 2: PCR sin aditivo, 25 ng de ADN
- Carril 3: PCR sin aditivo, 10 ng de ADN
- Carril 4: PCR sin aditivo, 5 ng de ADN
- 35 Carril 5: PCR sin aditivo, 1 ng de ADN
- Carril 6: PCR sin aditivo, sin control de molde
- Carril 7: PCR sin aditivo, 50 ng de ADN
- Carril 8: PCR sin aditivo, 25 ng de ADN
- Carril 9: PCR sin aditivo, 10 ng de ADN
- 40 Carril 10: PCR sin aditivo, 5 ng de ADN
- Carril 11: PCR sin aditivo, 1 ng de ADN
- Carril 12: PCR sin aditivo, sin control de molde

45 Figura 2 Amplificación de ADN genómico en presencia de hexámeros terminados en pireno según el Ejemplo 2.

- Carril 1: polimerasa Taq, 30 ng de ADN
- Carril 2: polimerasa Taq, 3 ng de ADN
- Carril 3: polimerasa Taq, 0,3 ng de ADN
- Carril 4: polimerasa Taq, hexámeros terminados en pireno, 30 ng de ADN
- Carril 5: polimerasa Taq, hexámeros terminados en pireno, 3 ng de ADN
- 50 Carril 6: polimerasa Taq, hexámeros terminados en pireno, 0,3 ng de ADN

Figura 3 Amplificación en los octámeros terminados en pireno o estilbeno según el Ejemplo 4

- Carriles 1 a 6: Productos de PCR formados en ausencia de aditivo con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN humano, respectivamente.
- Carriles 7 a 12: Productos de PCR formados en presencia de octámeros 100 M terminados en pireno, con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN humano, respectivamente.
- Carriles 13 a 18: Productos de PCR formados en presencia de octámeros 100 M terminados en estilbeno, con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN humano, respectivamente.

55 Figura 4 Análisis de curvas de fusión de PCR en tiempo real según el Ejemplo 7 Fig. 4a PCR de diversas cantidades de ADN genómico y análisis de curvas de fusión sin hexámeros terminados en pireno Fig. 4b PCR de diversas cantidades de ADN genómico y análisis de curvas de fusión con hexámeros terminados en pireno

Figura 5 RT-PCR en tiempo real según el Ejemplo 9

5a: síntesis de ADNc de primera cadena en presencia de hexámeros terminados y PCR posterior en ausencia de hexámero con grupo terminal, 5b: síntesis de ADNc de primera cadena en presencia de hexámeros con grupo terminal y PCR posterior en presencia de hexámero con grupo terminal, 5c: síntesis de ADNc de primera cadena en presencia de hexámeros con grupo terminal y PCR posterior en ausencia de hexámero con grupo terminal, 5d: síntesis de ADNc de primera cadena en ausencia de hexámero con grupo terminal y PCR posterior en presencia de hexámero con grupo terminal.

10 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

15 Ejemplos

Se sintetizaron oligonucleótidos aleatorizados mediante métodos estándares en un sintetizador ABI 394 a escala de 10 μ moles en el modo sin tritilos, utilizando fosfato CPG(2-[2-(4,4'-dimetoxitritioxi)etilsulfonil]etil-2-succiniloil)-alquilamino de cadena larga-CPG) disponible comercialmente como soporte sólido y una mezcla equimolar (Σ 0,1 moles) de fosforamiditas estándares dA(bz), dT, dG (iBu), dC(Bz); la desprotección se llevó a cabo bajo condiciones estándares con amonio o NaOH y el producto se desaló mediante diálisis.

20 Ejemplo 1

Se analizaron los hexámeros terminados en 5'-pireno en la amplificación de ADN. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en presencia o en ausencia de hexámeros 100 μ M con terminación pireno en reacciones de 50 ml que contenían 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN genómico humano, Tris-HCl 30 mM, pH 8,6, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, dNTP 0,2 μ M cada uno y cebadores 0,4 μ M (SEC ID n° 1 ATT AGA GAA CCA TGT TAA CAC TAC CG y SEC ID n° 2 GAG GTG AAT GAC CAC TGT TTA TTT TC) y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. Se utilizaron las condiciones de ciclado siguientes: desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C y 35 ciclos de 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 62°C, 60 segundos de elongación a 72°C y una etapa final de elongación de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Se ilustran los resultados en la fig. 1, que muestra una clara mejora de la especificidad de la amplificación en la presencia de hexámeros con terminación pireno.

35 Ejemplo 2

Se analizaron los hexámeros terminados en 5'-pireno mediante PCR en tiempo real. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en presencia o en ausencia de hexámeros con terminación pireno en reacciones de 20 ml que contenían 30 ng, 3 ng ó 0,3 ng de ADN genómico humano, Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, CHAPS 0,2 mM, BigChap 1 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 3 mM y cebadores 0,4 μ M (SEC ID n° 3 GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT GC y SEC ID n° 4 GAA TCT CCA TTC ATT CTC AAA AGG ACT), desoxinucleótidos 0,2 μ M y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. Se llevó a cabo la PCR en un instrumento LightCycler[®]480 con las condiciones de ciclado siguientes: desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C y 45 ciclos de 1 segundos de desnaturalización a 95°C, 10 segundos de hibridación a 65°C y 10 segundos de elongación a 72°C. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (fig. 2). El resultado muestra una clara mejora de la especificidad de amplificación con los hexámeros con terminación pireno.

50 Ejemplo 3

Se analizaron los pentámeros con terminación 5'-pireno en el mismo diseño experimental al descrito en el Ejemplo 2. Las concentraciones finales sometidas a ensayo eran 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M y 200 μ M. Se formó una diversidad de productos de PCR en la reacción de control (sin aditivo), mientras que en presencia de cantidades crecientes de pentámeros con terminación pireno, se formó el producto deseado con un rendimiento incrementado. La especificidad y la sensibilidad eran significativamente más altas que en el experimento de control, sin aditivos (no mostrado).

60 Ejemplo 4

Se sometieron a ensayo octámeros con terminación 5'-pireno y octámeros con terminación estilbena a una concentración final de 100 μ M para la amplificación de un fragmento génico de colágeno humano con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN humano utilizando el mismo tampón de PCR indicado en el Ejemplo 1. Los

cebadores de PCR (SEC ID nº 5 TAA AGG GTC ACC GTG GCT TC y SEC ID nº 6 CGA ACC ACA TTG GCA TCA TC) se utilizaron a una concentración de 0,4 µM. El volumen total de reacción era de 50 µl. Se llevó a cabo el ciclado de PCR en un ciclador de bloque con una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C, 4 minutos a 72°C y una etapa final de elongación a 72°C durante 7 minutos.

Se ilustra el resultado en la fig. 3. En ausencia de aditivo, se formó un producto no específico de aproximadamente 550 pb. No se observó producto no específico en presencia de oligonucleótidos sin grupo terminal. Los octámeros con terminación estilbeno condujeron a una fuerte fluorescencia en el fondo del gel.

Ejemplo 5

Se analizaron los monómeros con terminación 5'-pireno mediante PCR en tiempo real. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en presencia o en ausencia de monómeros con terminación pireno (hasta 400 µM) o de hexámeros con terminación pireno (hasta 400 µM) en reacciones de 20 µl que contenían 30 ng, 3 ng, 0,3 ng, 0,01 ng y 0 ng de ADN genómico humano, Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, CHAPS 0,2 mM, BigChap 1 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 3 µM y cebadores 0,4 µM (SEC ID nº 7 CAC CCC GTG CTG CTG ACC GA y SEC ID nº 8 AGG GAG GCG GCC ACC AGA AG), desoxinucleótidos 0,2 µM y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. Se llevó a cabo la PCR en un instrumento LightCycler[®]480 con las condiciones de ciclado siguientes: desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C y 45 ciclos de 1 segundo de desnaturalización a 95°C, 15 segundos de hibridación a 65°C y 5 segundos de elongación a 72°C. Se separaron los productos de amplificación en un gel de agarosa y se visualizaron utilizando tinción con bromuro de etilo. Los resultados muestran una clara mejoría de la especificidad de la amplificación con hexámeros con terminación pireno, pero ningún incremento de especificidad con el monómero con terminación pireno en comparación con la reacción de control (no mostrada).

Ejemplo 6

Se sometieron a ensayo hexámeros 3'-fosforilados sin molécula orgánica en el extremo 5' a una concentración final de hasta 200 µM en la amplificación de un fragmento génico de colágeno humano con 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN humano utilizando el mismo tampón de PCR indicado en el Ejemplo 1. Los cebadores de PCR (SEC ID nº 5 TAA AGG GTC ACC GTG GCT TC y SEC ID nº 6 CGA ACC ACA TTG GCA TCA TC) se utilizaron a una concentración final de 0,4 µM. El volumen total de reacción era de 50 µl. Se llevó a cabo el ciclado de PCR en un ciclador de bloque con una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 4 minutos a 72°C y una etapa final de elongación a 72°C durante 7 minutos. Se separaron los productos de amplificación en un gel de agarosa y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio. Los resultados no mostraron diferencias en las composiciones de productos de PCR, con independencia de la presencia o no de hexámeros (no mostrados).

Ejemplo 7

Se analizaron los hexámeros con terminación 5'-pireno mediante PCR en tiempo real. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en presencia o en ausencia de hexámeros con terminación pireno en reacciones de 20 µl que contenían 30 ng, 3 ng, 0,3 ng, 0,01 ng y 0 ng de ADN genómico humano, Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, CHAPS 0,2 mM, BigChap 1 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 3 mM y cebador 0,4 µM (SEC ID nº 3 GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT GC y SEC ID nº 4 GAA TCT CCA TTC ATT CTC AAA AGG ACT), desoxinucleótidos 0,2 µM deoxynucleotides y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq y SYBR Green (1:40.000). Se llevó a cabo la PCR en un instrumento LightCycler[®]480 con las condiciones de ciclado siguientes: desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C y 45 ciclos de 1 segundo de desnaturalización a 95°C, 10 segundos de hibridación a 65°C y 10 segundos de elongación a 72°C. Para la cuantificación relativa de los productos específicos y no específicos se generaron las curvas de fusión según el protocolo recomendado para el LightCycler 480. Se muestran los resultados en la figura 4. En ausencia de aditivo (figura 4A), se forma una cantidad elevada de producto no específico; en presencia de aditivo (figura 4B) se reduce fuertemente la cantidad de producto no específico.

Ejemplo 8

Con el fin de someter a ensayo si los hexámeros con terminación 5'-pireno también pueden utilizarse en la RT-PCR, con otra ADN polimerasa, y si el aditivo influye sobre los valores de pc de la reacción de PCR. Se llevó a cabo una reacción de RT-PCR utilizando las sondas de hidrólisis LightCycler[®]480 RNA Master basadas en la polimerasa Tth (Roche Applied Science, nº de cat. 04991885001). Las mezclas de reacción de 20 µl contenían ARN total de células hepáticas humanas, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg y 0 pg, respectivamente, 7,4 µl de RNA Master, acetato de manganeso 3,25 mM y 0,5 µM de cada cebador (SEC ID nº 9 TGCAGCCTCCATAACCATGAG y SEC ID nº 10 GATGCCTGCCATTGGACCTA) y sonda de hidrólisis 0,25 µM (SEC ID nº 11 FAM -GATGCCTGCCATTGGACCTA-TAMRA). Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de hexámeros con terminación pireno o con 50 µM, 100 µM ó 200 µM de hexámeros con terminación pireno. Se llevó a cabo la RT-PCR en un instrumento LightCycler[®]480

según el protocolo recomendado por el fabricante. Se muestran los valores de pc en la Tabla 1. Los hexámeros con terminación pireno no presentaron ninguna influencia sobre los puntos de cruce. No se produjo ningún retraso de las señales de amplificación ni pérdida de sensibilidad.

5

Tabla 1:

Concentración de ARN (pg/20 ml)	Punto de cruce del producto de PCR			
	Sin aditivo	50 mM	100 mM	200 mM
100	32,06	32,06	32,21	31,90
10	35,73	34,91	35,77	35,56
1	38,05	38,02	38,02	38,85
0,1	-	-	-	-

Ejemplo 9

10 Con el fin de evaluar si el incremento de especificidad también podía observarse en la síntesis del ADNc, los presentes inventores llevaron a cabo un experimento de RT-PCR de dos etapas en un diseño de reacción similar a las condiciones de la RT-PCR de una etapa. Se llevaron a cabo cuatro reacciones en paralelo:

- 15 (a) síntesis de ADNc de primera cadena en ausencia de hexámero con grupo terminal y PCR posterior en presencia de hexámeros con grupo terminal,
 (b) síntesis de ADNc de primera cadena en ausencia de hexámeros con grupo terminal 5' y PCR posterior en
 20 ausencia de hexámeros con grupo terminal,
 (c) síntesis de ADNc de primera cadena en ausencia de hexámeros con grupo terminal 5' y PCR posterior en ausencia de hexámeros con grupo terminal,
 (d) síntesis de ADNc de primera cadena en presencia de hexámeros con grupo terminal 5' y PCR posterior en presencia de hexámeros con grupo terminal.

20 Se seleccionó una pareja de cebadores que causa la formación de productos no específicos en caso de presencia de cantidades bajas de ARN en la reacción de RT-PCR: cebadores G6PDH directo (SEC ID nº 12 GCA AAC AGA GTG AGC CCT TC) y G6PDH inv. (SEC ID nº 13 GGG CAA AGA AGT CCT CCA G). Se sintetizó ADNc en reacciones de 20 ml que contenían cebadores 0,5 µM, 0,6 unidades de Transcriptor (Roche Applied Sciences, nº de cat. 03531317001), Tris-HCl 30 mM, pH 8,6, MgCl₂ 3 mM, 200 µM de dATP, 200 µM de dGTP, 200 µM de dCTP, 600 µM de dUTP, KCl 20 mM, CHAPSO 0,2 mM, BigChap 1 mM, proteína 32 del gen T4 125 ng/ml, SYBRGreen a una dilución final de 1:20.000 y 10 pg de ARN total procedente de células HeLa. Se prepararon dos muestras para la síntesis de ADNc, una con 100 µM de hexámero con terminación pireno y la otra sin hexámero con terminación pireno. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C y se enfriaron sobre hielo. Se llevó a cabo la PCR en 20 ml de volumen de reacción utilizando 2 ml de mezclas de reacción de ADNc, 0,5 µM de cebadores, 1,2 unidades de polimerasa Taq en el mismo tampón indicado para la mezcla de reacción de ADNc en presencia o en ausencia de hexámero con terminación pireno adicional a una concentración final de 100 µM. Las reacciones se incubaron en un instrumento LightCycler 480 a 95°C durante 2 minutos y 45 ciclos de 95°C/10 segundos, 60°C/10 segundos y 72°C/13 segundos. Se muestran los perfiles de fusión de los productos de amplificación en la figura 5a-d. En las reacciones en las que se encontraba presente hexámero con terminación pireno durante la síntesis de ADNc (5a y 5b), se formó un único producto con el punto de fusión esperado. En el caso de que la síntesis de ADNc se llevase a cabo en ausencia de hexámero con terminación pireno (5c y 5d), se generaron varios productos que presentaban temperaturas de fusión diferentes de la del producto específico. Este resultado demuestra que el hexámero con terminación pireno es capaz de suprimir la formación de producto no específico durante la transcripción inversa del ARN.

Ejemplo 10

45 El hexámero con terminación 5'-pireno 100 µM con un solapamiento de 6 pares de bases con el extremo 3' de uno de los cebadores (pirén-CGGTAG-3'-fosfato) se analizó en paralelo al hexámero con terminación 5'-pireno 100 µM no complementario a los cebadores (pirén-CTTTTA-3'-fosfato) en la amplificación del ADN. En reacciones de 50 ml que contenían 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng y 0 ng de ADN genómico humano, Tris-HCl 30 mM, pH 8,6, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, dNTP 0,2 µM cada uno y cebadores 0,4 µM (SEC ID nº 1 ATT AGA GAA CCA TGT TAA CAC TAC CG y SEC ID nº 2 GAG GTG AAT GAC CAC TGT TTA TTT TC) y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq. Se llevó a cabo la PCR en un ciclador de bloque con las condiciones de ciclado siguientes: desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C y 35 ciclos de 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 62°C, 60 segundos de elongación a 72°C y una etapa final de elongación de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Se llevó a cabo en paralelo una reacción de control en ausencia de aditivo. En presencia de pirén-CGGTAG-3'-fosfato no podía detectarse ningún producto de PCR. En las muestras que contenían el pirén-CTTTTA-fosfato no complementario, se

55

alcanzó un rendimiento de producto y sensibilidad similares a los observados en la reacción de control (en ausencia de ningún aditivo).

LISTADO DE SECUENCIAS

5

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

<120> Amplificación de ácidos nucleicos en presencia de oligómeros aleatorios modificados

<130> 24836 EP1

<150> EP08005100

<151> 2008-03-19

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

attagagaac catgtaac actaccg 26

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gaggatgaatg accactgttt attttc 26

10

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 3

ggaagtacag ctcagagttc tgc 23

20

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> cebador

ES 2 450 073 T3

<400> 4

5 gaatctccat tcattctcaa aaggact 27

 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

 <220>
 <223> cebador

 <400> 5

15 taaaggtca ccgtggcttc 20

 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

 <220>
 <223> cebador

25

 <400> 6

 cgaaccacat tggcatca 18

30

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

 <220>
 <223> cebador

 <400> 7

40 caccccgtagc tgctgaccga 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 8

 agggaggcgg caccagaag 20

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 9

ES 2 450 073 T3

tgcagcctcc ataaccatga g 21

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
<400> 10

gatgcctgcc attggaccta 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
<400> 11

gatgcctgcc attggaccta 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
<400> 12

gcaaacagag tgagcccttc 20

<210> 13
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador
<400> 13

5 gggcaaagaa gtcctccag 19

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
 - 5 - una ADN polimerasa termoestable,
- desoxinucleótidos,
- un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con una fracción orgánica hidrofóbica,
10 en el extremo 5' de dicho oligonucleótido aleatorizado, en la que dicha fracción es un pireno o un estilbena, y - una pareja de cebadores de amplificación.
2. Composición según la reivindicación 1, que comprende además una muestra de ácido nucleico diana.
3. Kit que comprende:
 - 15 - una ADN polimerasa termoestable, y
- un oligonucleótido 5-8-mero aleatorizado, caracterizado porque dicho oligonucleótido comprende una modificación con pireno o un estilbena en el extremo 5'.
- 20 4 .Kit según la reivindicación 3, que comprende además una pareja de cebadores de amplificación.
5. Método para la amplificación por PCR de un ácido nucleico diana específico, que comprende las etapas de:
 - 25 - proporcionar una muestra que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico diana,
- añadir una composición según la reivindicación 1, y
- llevar a cabo una reacción de amplificación por PCR.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción en cadena de la polimerasa de la cual se realiza un seguimiento en tiempo real.
- 30 7. Método según las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado porque el producto de amplificación generado en dicha amplificación se somete a un análisis de curva de fusión.

Fig. 1

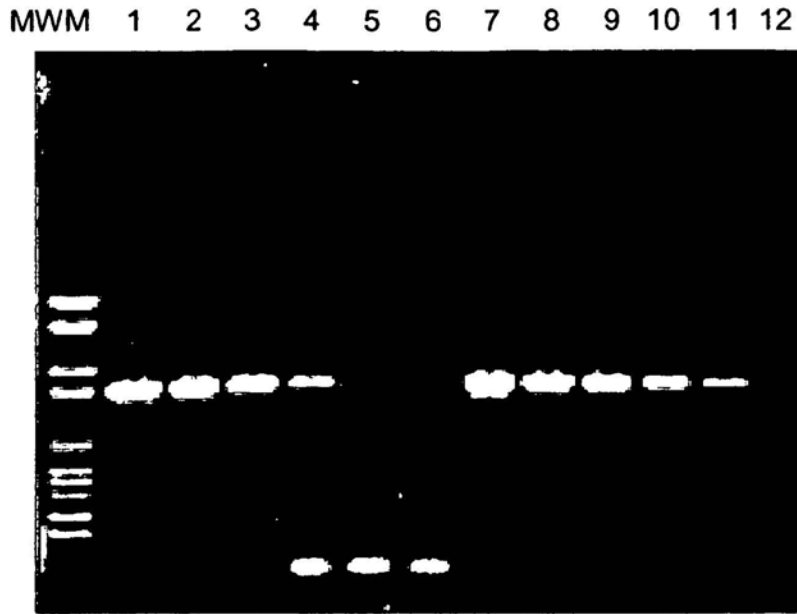


Fig. 2

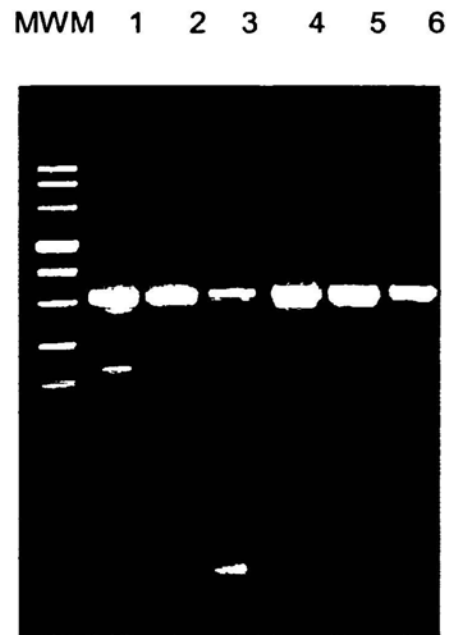


Fig. 3

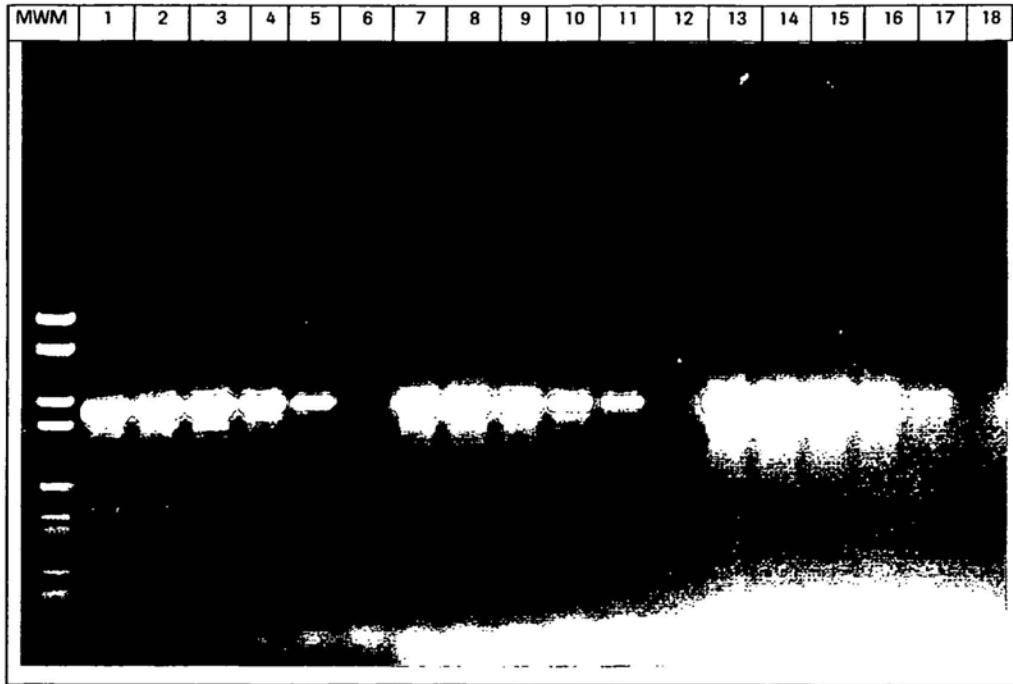


Fig. 4

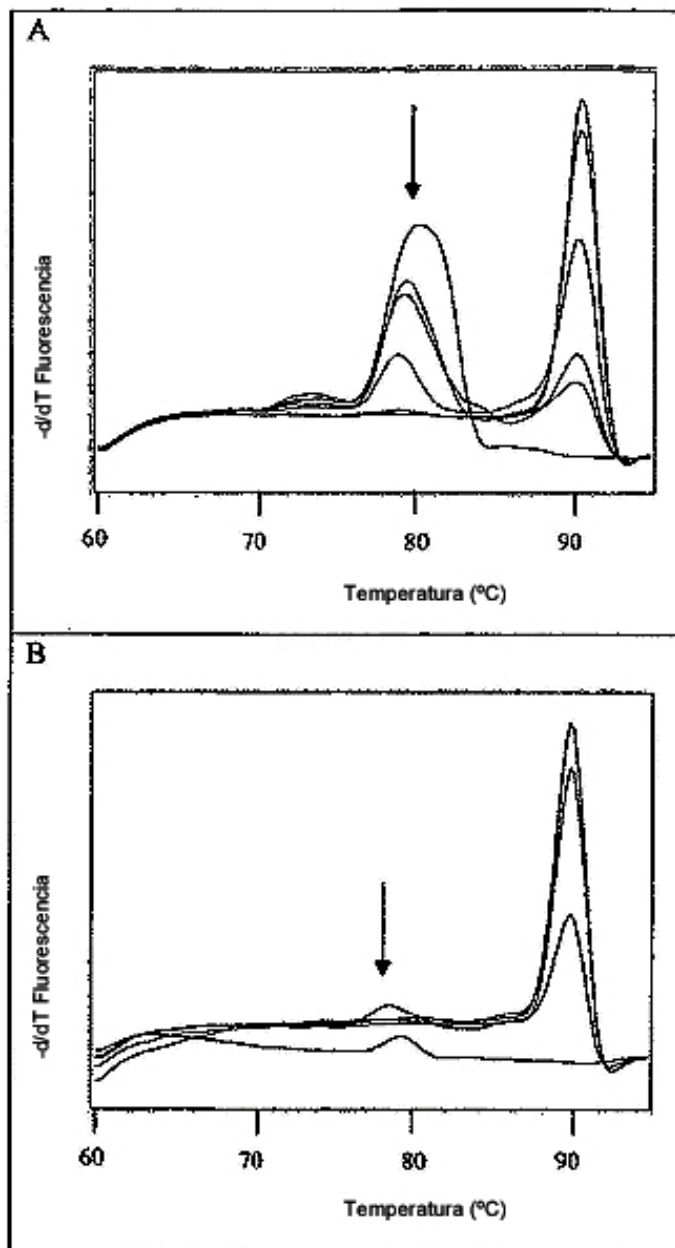
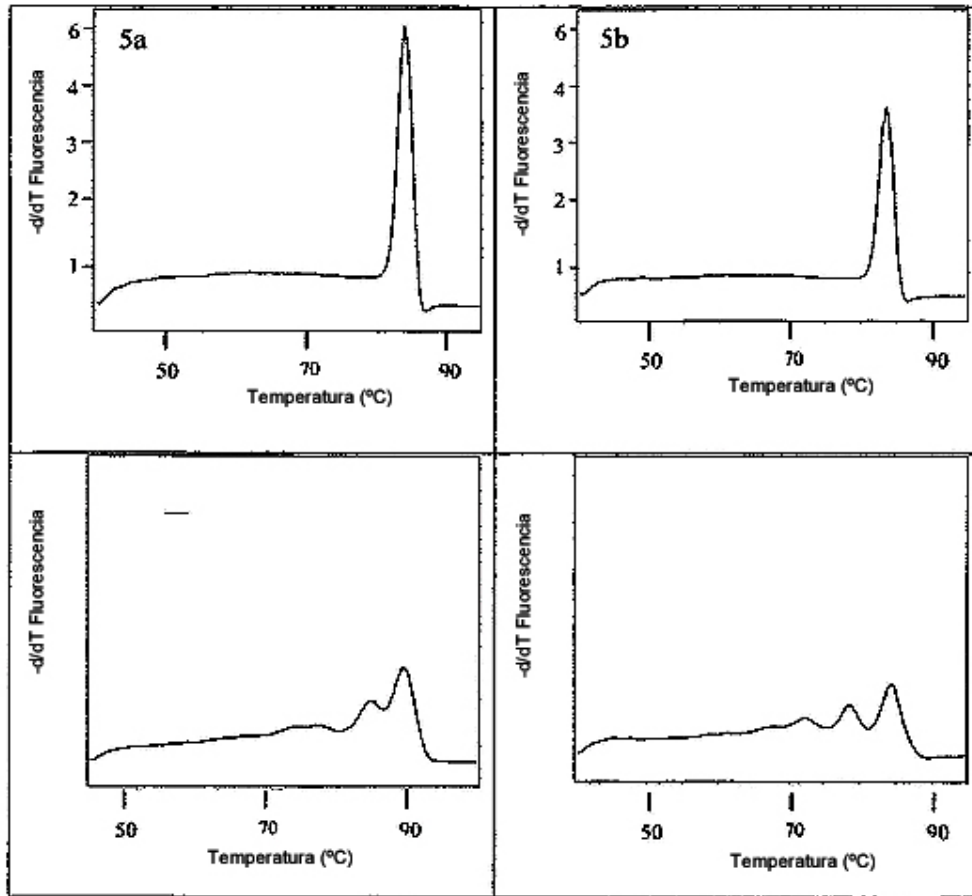


Fig. 5

5a

5b



5c

5d