

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 925**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008 E 08838229 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2198059**

54 Título: **Métodos para la detección mejorada de moléculas pequeñas de RNA**

30 Prioridad:

09.10.2007 US 978657 P

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

16.01.2015

73 Titular/es:

**KUTYAVIN, IGOR VASSILY (100.0%)
18943 203RD AVENUE NORTHEAST
WOODINVILLE, WA 98077, US**

72 Inventor/es:

KUTYAVIN, IGOR VASSILY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 925 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

Métodos para la detección mejorada de moléculas pequeñas de RNA

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos mejorados para la mejora de moléculas de RNA. Más particularmente, la invención se refiere al uso de nucleósido-trifosfatos modificados en la base y estabilizadores de dúplex en reacciones de transcripción inversa para la mejora de la estabilidad de dúplex durante la detección subsiguiente basada en amplificación de secuencias cortas de RNA, tales como miRNA.

10 Los micro-RNAs (miRNAs) son una clase muy conservada de moléculas pequeñas de RNA que se transcriben a partir de DNA pero no se traducen en proteína. Los miRNAs se procesan en moléculas monocatenarias de ~ 17-24 nucleótidos (nt) que se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y han sido identificados como reguladores clave del desarrollo y la proliferación, apoptosis y diferenciación celular. RISC media la regulación decreciente de la expresión génica por inhibición de la traducción, escisión de transcritos, o ambas cosas. RISC está implicado también en la silenciamiento de la transcripción en el núcleo de una amplia gama de eucariotas.

15 Los miRNAs y otras moléculas pequeñas de RNA han sido implicados en cierto número de enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedad cardiovascular, infección viral y trastornos metabólicos. De acuerdo con ello, es crucial disponer de métodos analíticos específicos y sensibles para detección de cuándo, dónde y a qué niveles se expresan los RNAs pequeños (sea regulados en sentido creciente o decreciente), a fin de conseguir el potencial de diagnóstico y terapéutico plenos de esta nueva clase importante de dianas. Lamentablemente, debido a su pequeño tamaño, la aplicación de metodologías convencionales de detección de ácidos nucleicos, tales como las técnicas basadas en amplificación, a la detección de RNAs pequeños ha sido problemática. Su pequeño tamaño ofrece poca secuencia para diseño de sondas de hibridación y, de hecho, la mayoría de los cebadores convencionales de PCR son similares en longitud a los miRNAs propiamente dichos.

20 Se han utilizado diversos métodos para la detección de miRNAs que incluyen transferencias Northern, extensión de cebadores, ribozimas de amplificación de señal y algunas técnicas basadas en amplificación. Sin embargo, estas y otras estrategias convencionales para detección de RNAs pequeños han estado asociadas con problemas relacionados con especificidad, sensibilidad, coste y/o facilidad de implementación.

25 Por tanto, existe en la técnica necesidad de composiciones versátiles, simples y económicas, métodos y kits para uso en la detección de secuencias pequeñas de RNA, que permitan amplificación y detección rápida y robusta. La presente invención aborda estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra cebadores ilustrativos directos e inversos diseñados para la detección de miR-155 por reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

La Figura 2 muestra la eficiencia y sensibilidad de detección mejoradas conseguidas por incorporación de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en una cadena de cDNA antes de la amplificación por PCR.

35 Sumario de la invención

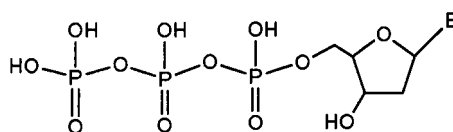
Como se ha indicado arriba, la presente descripción se refiere en general al uso de nucleósido-trifosfatos modificados en la base y estabilizadores de dúplex en reacciones de transcripción inversa para la mejora de la estabilidad de dúplex durante la detección subsiguiente basada en amplificación de secuencias cortas de RNA, tales como miRNA.

40 Para ello, se proporciona un método para transcripción inversa de al menos una secuencia diana de RNA, tal como una secuencia diana de RNA pequeña, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una secuencia diana de RNA con: (i) un cebador que es suficientemente complementario a la secuencia diana de RNA para hibridarse a ella, y (ii) una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa; y (b) sintetizar cDNA complementario a la secuencia diana de RNA en presencia de una mezcla de dNTPs que comprende al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex que es un sustrato para la DNA-polimerasa dependiente de RNA.

45 Esencialmente, cualquier dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex puede utilizarse conforme a la presente invención, con tal que el mismo sea un sustrato para la DNA-polimerasa dependiente de RNA y con la condición adicional de que el mismo dé como resultado propiedades de hibridación mejoradas, como se describen en esta memoria, cuando se incorpora en cDNA.

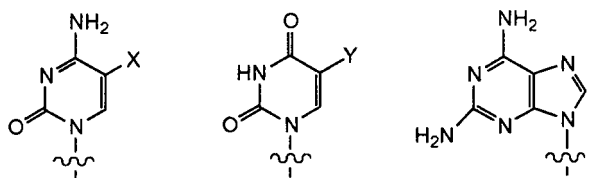
50 En algunas realizaciones de la invención, por ejemplo, el dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex es una pirimidina sustituida en la posición 5, y que es un sustrato para una enzima transcriptasa inversa.

En algunas realizaciones, el dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex comprende un compuesto que tiene la estructura siguiente:

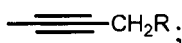


donde B se selecciona de:

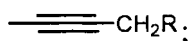
5



X se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃ o



Y se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I o



10 y

R es -H, -OH, -OCH₃ o -NH₂.

En algunas realizaciones, el dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex se selecciona de d(2-amA)TP, d(5-PrU)TP, d(5-PrC)TP, o una combinación de los mismos.

15 La invención se emplea en la detección de secuencias diana de RNA pequeñas en donde la detección por métodos basados en amplificación por técnicas convencionales ha resultado problemática. En ciertas realizaciones, la diana de RNA es una diana de RNA pequeña, tal como una secuencia de RNA de aproximadamente 10-30 nucleótidos de longitud. En ciertas otras realizaciones, la secuencia diana de RNA pequeña es miRNA.

20 Además de la incorporación de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en cDNA durante la transcripción inversa, se entenderá que los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex pueden incorporarse también en los cebadores u otros oligonucleótidos utilizados durante la transcripción inversa y/o durante la amplificación subsiguiente para mejorar ulteriormente sus propiedades de hibridación, y pueden incorporarse adicionalmente en los productos de amplificación sintetizados durante la amplificación, si es necesario o si se desea.

25 En algunas realizaciones de la invención, el cebador utilizado en la síntesis de cDNA se utiliza también como cebador inverso en una realización de amplificación subsiguiente, mientras que, en otra realización, se utiliza un cebador inverso diferente.

30 En algunas realizaciones, el método arriba descrito comprende además los pasos de: (a) tratar el cDNA formado en el paso (b) para proporcionar cDNA monocatenario; y (b) poner en contacto el cDNA monocatenario con un segundo cebador que es suficientemente complementario al cDNA para hibridarse al mismo e iniciar la síntesis de un producto de extensión en presencia de una DNA-polimerasa a fin de producir una molécula de cDNA bicatenario.

35 En algunas realizaciones, la invención comprende además el paso de realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando cebadores de amplificación que son suficientemente complementarios a la secuencia diana de DNA pequeña y su complemento para hibridarse a ella y dar lugar a productos de amplificación en presencia de DNA-polimerasa. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción en cadena de polimerasa. Como se ha indicado arriba, la reacción de amplificación puede realizarse opcionalmente en presencia de una mezcla de dNTPs que contienen al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex, de tal modo que los dNTPs modificados se incorporan en los productos de amplificación.

40 Conforme a otro aspecto de la descripción, se proporcionan mezclas de reacción utilizadas en la realización de los métodos de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una mezcla de reacción de la invención comprende (a) una muestra que comprende una secuencia diana de RNA, tal como al menos una secuencia diana de RNA pequeña; (b) un cebador que es suficientemente complementario a la secuencia diana de RNA para hibridarse con ella, (c) una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa; y (d)

una mezcla de dNTPs que contiene al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex, como se describe en esta memoria, que es un sustrato para la DNA-polimerasa dependiente de RNA.

Conforme a otro aspecto, la descripción proporciona kits que comprenden componentes necesarios o importantes para la práctica del método descrito. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende (a) una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa; y (b) al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex, como se describe en esta memoria, que es un sustrato para la DNA-polimerasa dependiente de RNA. El kit puede comprender además cualquiera de cierto número de componentes adicionales que incluyen, por ejemplo, uno o más cebadores que se hibridan específicamente a una o más secuencias diana de RNA, para uso durante la transcripción inversa y/o la amplificación de la secuencia diana de RNA.

Descripción detallada de la invención

Como se ha indicado arriba, la presente invención se refiere en general a la amplificación y detección mejoradas de dianas pequeñas de RNA, como miRNA y siRNA. Más específicamente, la invención se refiere a métodos mejorados para la detección de secuencias diana de RNA pequeñas por transcripción inversa de una secuencia diana de RNA en presencia de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en condiciones en las que los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex se incorporan en el cDNA que es sintetizado por una DNA-polimerasa dependiente de RNA. Por incorporación de los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en cDNA durante la transcripción inversa, para producir un cDNA modificado, cuando un componente polinucleotídico se hibrida al cDNA modificado durante las manipulaciones subsiguientes (v.g., durante la amplificación subsiguiente), se forma un complejo de hibridación que tiene estabilidad mejorada. Como resultado, pueden lograrse por ejemplo mejoras en rendimiento y sensibilidad durante las reacciones de amplificación subsiguientes por la práctica de los métodos de esta memoria. Pueden conseguirse mejoras adicionales, conforme a la presente invención, por incorporación opcional de uno o más dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en una reacción de amplificación subsiguiente a la transcripción inversa y/o en los cebadores u otros oligonucleótidos auxiliares empleados durante la transcripción inversa y/o la amplificación.

En general, los aspectos de la invención descritos en esta memoria pueden utilizarse para favorecer virtualmente cualquier ensayo que esté basado en síntesis, amplificación y/o detección de moléculas pequeñas de RNA, con tal que al menos un componente oligonucleotídico (v.g., uno o más cebadores oligonucleotídicos y/o una o más sondas)) se hibride al DNA modificado, como se describe en esta memoria, con mayor estabilidad que lo que ocurriría si el DNA no estuviera modificado de este modo. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica apreciarán además que la presente descripción puede favorecer los ensayos de detección de RNA de diversas maneras, por ejemplo por expansión y simplificación del diseño de los componentes oligonucleotídicos para amplificación y/o detección, haciendo posibles la amplificación y detección de secuencias de RNA (v.g., secuencias de RNA pequeñas) que han sido problemáticas utilizando los métodos convencionales, por aceleración de las etapas de amplificación y/o detección (v.g., reducción del tiempo de ensayo), etc.

La práctica de la presente descripción, así como los términos y símbolos de bioquímica, química de ácidos nucleicos, biología molecular y genética molecular, a no ser que se indique otra cosa, seguirán los comprendidos convencionalmente en la técnica, como se explica más detalladamente en la bibliografía. Véase, v.g., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Sambrook et al., editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., U.S. Pat. No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Kornberg y Baker, DNA Replication, Segunda Edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Gaits, ed., Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford7, 1984); Lehninger, Biochemistry, Segunda Edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Eckstein, ed., Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, Nueva York, 1991; y análogos.

Definiciones

Los términos que siguen tienen los significados expresados en esta memoria a no ser que se indique expresamente lo contrario. Debe indicarse que el término "un" o "uno(a)" entidad hace referencia a uno(a) o más de dicha entidad; por ejemplo, debe entenderse que "un ácido nucleico" significa uno o más ácidos nucleicos. Como tales, los términos "un" (o "uno(a)"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse intercambiabilmente en esta memoria.

El término "muestra", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia que contiene o se supone contiene un ácido nucleico de interés, e incluye así una muestra de ácido nucleico, células, organismos, tejidos, fluidos (v.g., fluido espinal o fluidos linfáticos), y muestras que incluyen pero sin carácter limitante plasma, suero, orina, lágrimas, heces, tractos respiratorio y genitourinario, saliva, fragmentos de órganos diferentes, tejido(s), células de la sangre, muestras de cultivos de células in vitro, aislados de fuentes naturales y objetos o especímenes que se sospecha contienen moléculas de ácido nucleico. Las muestras pueden derivarse de tejidos normales, tejidos enfermos y/o tejidos de individuos que se sospecha padecen una enfermedad.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan intercambiamente en esta memoria, y cada uno de ellos significa un polímero lineal de monómeros nucleotídicos. Los polinucleótidos abarcan típicamente en tamaño desde un pequeño número de unidades monómeras, *v.g.*, 5-40, cuando se hace referencia usualmente a los mismos como "oligonucleótidos", hasta varios miles de unidades monómeras. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, lo cual depende a su vez de la función o utilización última del oligonucleótido. El oligonucleótido puede generarse de cualquier manera, con inclusión de síntesis química, replicación de DNA, transcripción inversa, o una combinación de las mismas. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido se representa por una secuencia de letras, por ejemplo, "CCGTATG", debe entenderse en esta memoria, a no ser que se indique específicamente otra cosa en el texto, que los nucleótidos se expresan en el orden 5' → 3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina, y "T" denota desoxitimidina, a no ser que se indique o sea evidente otra cosa por el contexto. Usualmente, los polinucleótidos de DNA comprenden estos cuatro desoxirribonucleósidos unidos por enlace fosfodiéster, mientras que el RNA comprende sus cuatro equivalentes de ribosa con uridina ("U") en lugar de "T".

El término "cebador oligonucleotídico" o "cebador", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula monocatenaria de DNA o RNA que es suficientemente complementaria a una secuencia diana para hibridarse a ella y cebar la síntesis enzimática de una cadena de ácido nucleico en presencia de una DNA-polimerasa. El ácido nucleico diana sirve como molde para el cebador oligonucleotídico. Los cebadores se utilizan tanto en reacciones de transcripción inversa como en reacciones de amplificación, como se describe en esta memoria. Un cebador oligonucleotídico puede existir naturalmente, como en un material purificado digerido por restricción, o puede producirse por síntesis. En aspectos particulares, se selecciona un cebador que tenga en su extremo 3' una región que es sustancialmente complementaria a una cadena de la secuencia específica del molde. Un cebador tiene que ser suficientemente complementario para hibridarse con una cadena molde para que pueda producirse la extensión del cebador. Una secuencia cebadora oligonucleotídica no precisa reflejar la secuencia exacta del molde a fin de hibridarse al mismo. Por ejemplo, un fragmento nucleotídico no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementario a la cadena. Una secuencia de cola 5', por ejemplo, puede incorporar un fragmento especial o combinación de fragmentos especiales que sirven para un propósito deseado, tal como mejorar la eficiencia, el rendimiento, la detectabilidad, etc., de las reacciones de transcripción inversa y/o amplificación, o que sean deseados o necesarios por la elección de las tecnologías de amplificación o detección empleadas. Por ejemplo, puede añadirse una secuencia de cola 5' para mejorar las propiedades de hibridación de los cebadores utilizados conforme a los métodos descritos en esta memoria. Otros ejemplos de secuencias especiales incluyen, pero sin carácter limitante, fragmentos que contienen sitios de fijación de sonda, secuencias de separación, secuencias de extensión de la diana, secuencias anti-cebador dímero, etc., como se conocen en la técnica. Adicionalmente, bases o secuencias más largas no complementarias pueden estar intercaladas dentro del cebador, con tal que la secuencia del cebador retenga complementariedad suficiente con la secuencia del molde para hibridarse y formar con ello un complejo molde-cebador para la síntesis del producto de extensión del cebador oligonucleotídico. Alternativa o adicionalmente, pueden incorporarse dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en uno o más cebadores utilizados conforme a la presente invención a fin de mejorar sus propiedades de fijación con tal que la presencia de los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex no haga imposible la hibridación a una secuencia diana o la posibilidad de sintetizar un producto de extensión a partir de la misma. En ciertas realizaciones, pueden utilizarse ventajosamente cebadores relativamente cortos (*v.g.*, tan pequeños como 8, 9 ó 10 nucleótidos) durante la transcripción inversa y/o la amplificación como resultado de las propiedades mejoradas de hibridación de tales cebadores cuando se incorporan dNTPs modificados en ellas.

Los términos "ácido nucleico diana" o "secuencia diana" o "ácido nucleico de interés" se refieren a un ácido nucleico o un fragmento de ácido nucleico que va a ser transcrito inversamente, amplificado y/o detectado utilizando uno o más métodos de la presente descripción. En algunas realizaciones, la secuencia diana es una secuencia de RNA pequeña, tal como miRNA o siRNA. El ácido nucleico diana puede derivarse de cualquier organismo u otra fuente, con inclusión, pero sin carácter limitante, de procariontes, eucariontes, plantas, animales, y virus, así como ácidos nucleicos sintéticos. Los ácidos nucleicos diana pueden contener DNA, RNA, y/o variantes o derivados de los mismos. Los ácidos nucleicos diana pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y cuando un ácido nucleico de interés es, o se supone que es bicatenario, el término "ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia específica en cualquier cadena del ácido nucleico bicatenario. Por tanto, un complemento completo a cualquier ácido nucleico monocatenario de interés se trata para realizaciones particulares en esta memoria como el mismo ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de interés pueden aislarse y purificarse a partir de una fuente de muestra antes de la aplicación de los métodos de la presente invención. Preferiblemente, los ácidos nucleicos diana están suficientemente exentos de proteínas y/o cualesquiera otras sustancias que interfieran con las reacciones de transcripción inversa, amplificación y/o detección. Muchos métodos reconocidos en la técnica están disponibles para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos diana, con inclusión de kits comerciales e instrumentos especiales. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse utilizando extracción orgánica con un reactivo orgánico fenol/cloroformo seguida por precipitación con etanol (Ausubel et al., editores, *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 1, capítulo 2, sección I, John Wiley & Sons, Nueva York, (1993). El método de adsorción en fase sólida (Walsh et al. (1991) *Biotechniques*, 10:506-513, Boom et al., Patente US núm. 5.234.809) y

precipitación inducida por sal (Miller et al (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215) son otros métodos adicionales conocidos para purificación de ácidos nucleicos.

La expresión "secuencias pequeñas de RNA" se refiere generalmente a secuencias de RNA que tienen longitudes de aproximadamente 15-100, 15-75, 15-50, 15-30 ó 15-25 nucleótidos de longitud. En realizaciones más particulares, una secuencia pequeña de RNA detectada conforme a la descripción tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 nucleótidos o más, o cualquier intervalo limitado por cualquiera de las longitudes anteriores. En ciertas realizaciones, la expresión RNAs pequeños se refiere a secuencias cortas de RNA no codificantes que incluyen micro-RNAs (mi), RNAs de interferencia cortos (si), RNAs temporales pequeños (st), siRNAs heterocromáticos, RNAs no codificantes diminutos, etc. Los RNAs pequeños pueden funcionar, por ejemplo en el control de la estabilidad o traducción del mRNA y/o pueden direccionar modificaciones epigenéticas a regiones específicas del genoma. Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención aborda en ciertos aspectos las dificultades asociadas con la detección de estas secuencias por métodos convencionales basados en amplificación debido a sus pequeñas longitudes.

La expresión "miRNA", como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias de microRNA que comprenden moléculas pequeñas de RNA codificadas en los genomas de plantas y animales. Los miRNAs son RNAs existentes naturalmente que tienen típicamente ~ 17-24 nucleótidos de longitud (v.g., 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos) que regulan la expresión de genes, muchos de los cuales están asociados a un estado de enfermedad u otra afección humana. El número de secuencias de miRNA identificadas hasta la fecha es grande y creciente, ejemplos ilustrativos de las cuales pueden encontrarse, por ejemplo, en "miRBase: secuencias de microRNA, dianas y nomenclatura de genes" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. *NAR*, 2006, 34, Edición de Base de Datos, D140-D144; "The microRNA Registry" Griffiths-Jones S. *NAR*, 2004, 32, Edición de Base de Datos, D109-D111; y también en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

Los términos "hibridación", "hibridización", o "reasociación" como se utilizan en esta memoria, se refieren a un proceso de interacción entre dos o más polinucleótidos que forman un complejo complementario por apareamiento de bases que es en la mayoría de los casos un dúplex o complejo bicatenario como fue descrito originalmente en Marmur J., Lane D. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:453-461 y Doty P. et al (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:461-476. La estabilidad de un dúplex de ácido nucleico puede medirse por la temperatura de fusión, o "T_m". El valor T_m de un dúplex de ácido nucleico particular en condiciones especificadas es la temperatura a la que, por término medio, se han disociado la mitad de los pares de bases.

La expresión "propiedades de hibridación" de un polinucleótido se refiere a la capacidad de este polinucleótido o un fragmento del mismo para formar un complejo específico de secuencia con otro polinucleótido complementario o su fragmento. La expresión "propiedades de hibridación" se refiere también generalmente en esta memoria a la estabilidad del complejo complementario. A este respecto, "propiedades de hibridación" se utiliza de modo similar a "temperatura de fusión" o "T_m".

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "DNAs modificados" se refiere a DNA que incorporan al menos un nucleótido modificado en la base y estabilizador de dúplex, como se describe en esta memoria. En ciertas realizaciones preferidas, el DNA modificado es un cDNA modificado producido por transcripción inversa de una secuencia diana de RNA en presencia de una mezcla de desoxinucleósido-5'-trifosfatos (dNTPs) que contienen al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex, como se describe en esta memoria.

La expresión "dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex" como se utiliza en esta memoria, se refiere a un desoxinucleósido-5'-trifosfato que contiene una base no natural (modificado en la base) y que, cuando se incorpora en un polímero con otros dNTPs, sean naturales o modificados en la base, en presencia de una DNA-polimerasa, proporciona un DNA modificado con propiedades de hibridación mejoradas (es estabilizador de dúplex). Un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex puede ser un análogo del dNTP natural respectivo, v.g., d(5-MeC)TP (5-metil-citosina) es un análogo de dCTP (citosina), d(2-ama)TP (2-amino-adenosina, al que se hace referencia también como 2,6-diamino-purina) es un análogo de dATP (adenosina), etc. Ejemplos ilustrativos de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex se describen ulteriormente en esta memoria. Un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex puede reemplazar completamente a su dNTP natural respectivo. Esto significa, por ejemplo, que, si se utiliza d(5-MeC)TP en la reacción de amplificación, la reacción no contiene dCTP. Alternativamente, un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex puede representar una fracción del dNTP natural respectivo. Esto significa que tanto dNTP natural como su análogo están presentes en la mezcla de reacción, y típicamente donde el dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex representa al menos una cierta proporción (v.g., 5%, 25%, 50%, ó 75%), de la cantidad molar del dNTP natural respectivo. Un cebador o cDNA o amplicón utilizado o sintetizado conforme a la invención puede comprender por tanto cualquier número adecuado o deseado de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex incorporados en él (v.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 25, 50, 75, 100, etc., y todos los números enteros comprendidos entre ellos).

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "transcripción inversa" se refiere a un proceso por el cual una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa extiende un cebador oligonucleotídico

hibridado a un molde de RNA, en presencia de desoxinucleósido-5-trifosfatos (dNTPs), sean naturales o modificados, dando como resultado la síntesis de DNA complementario (cDNA).

Una "DNA-polimerasa dependiente de RNA" o "transcriptasa inversa" ("RT") es una enzima que sintetiza una copia de DNA complementario a partir de un molde de RNA en un proceso al que se hace referencia como transcripción inversa. Se requiere un cebador para iniciar la síntesis con ambos moldes de RNA y cDNA.

Por "amplificación" o "amplificación de ácido nucleico" se entiende la producción de copias múltiples de un ácido nucleico diana que contiene al menos una porción de la secuencia de ácido nucleico diana específica propuesta. Puede hacerse referencia a las copias múltiples como amplicones o productos de amplificación. Típicamente, la porción amplificada contiene una secuencia diana detectable que puede detectarse utilizando cualquiera de una diversidad de métodos bien conocidos. Una de las técnicas más comunes de amplificación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requiere termociclación para desnaturalizar alternativamente ácidos nucleicos bicatenarios e hibridar los cebadores; sin embargo, otros métodos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos son isotérmicos. La reacción en cadena de polimerasa (Mullis et al., Patente U.S. No. 4.683.195; Mullis, Patente U.S. No. 4.683.202; y Mullis et al., Patente U.S. No. 4.800.159), a la que se hace referencia comúnmente como PCR, utiliza ciclos de desnaturalización múltiples, reasociación de pares de cebadores a cadenas opuestas, y extensión con cebadores para aumentar exponencialmente los números de copias de la secuencia diana. Se han descrito también muchas otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como se expone más adelante en esta memoria, y pueden aplicarse en el contexto de la presente invención.

Como se utiliza en esta memoria, "reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa" o "RT-PCR" se refiere a la técnica bien conocida para amplificación y detección de una secuencia diana de RNA en la que una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa (RT) se utiliza para producir un DNA complementario (cDNA) a partir de una secuencia diana de RNA, y el cDNA se amplifica luego por PCR para producir copias múltiples de DNA (v.g., Gelfand *et al.*, "Reverse Transcription with Thermostable DNA Polymerases-High Temperature Reverse Transcription", Patentes U.S. Nos. 5.322.770 y 5.310.652).

Por "amplificación detectable" se entiende que una señal detectable asociada con un producto de amplificación en una mezcla de reacción de amplificación aumenta por encima de un ruido de fondo predeterminado o nivel umbral (amplificación en el punto final) o aumenta por encima de un ruido de fondo o nivel umbral dentro de cierto periodo de tiempo (amplificación en tiempo real). Véase, v.g., Light *et al.*, "Method for Determining the Amount of an Analyte in a Sample", Solicitud de Patente U.S. Pub. No. US 2006-0276972, párrafos 506-549. El producto de amplificación contiene una secuencia que tiene identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico diana o su complemento y puede detectarse, por ejemplo, con un tinte de intercalación o una sonda de detección que tiene especificidad para una región de la secuencia de ácido nucleico diana o su complemento.

Por "condiciones de amplificación" se entiende condiciones que permiten la amplificación de ácido nucleico. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de transcripción inversa y/o amplificación de la presente invención se hibridan a sus dianas propuestas en condiciones de amplificación, pero pueden hibridarse o no en condiciones de hibridación severas. Si bien la sección de Ejemplos proporciona más adelante condiciones de amplificación ilustrativas para transcripción inversa y amplificación de secuencias de ácido nucleico diana conforme a la presente invención, se entenderá que pueden utilizarse también otras condiciones aceptables, y tales condiciones pueden ser averiguadas fácilmente por una persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica dependiendo de la secuencia particular que se detecte y/o el método de amplificación empleado.

La expresión "componente oligonucleotídico" se refiere a cualquier oligonucleótido o polinucleótido que se requiere o es útil para realizar las reacciones de transcripción inversa, amplificación y/o detección de la invención. Componentes oligonucleotídicos incluyen, pero sin carácter limitante, cebadores oligonucleotídicos, sondas, mejoradores de hibridación y escisión, efectores, etc. Los componentes oligonucleotídicos pueden estar etiquetados o tener modificaciones estructurales que incluyen las utilizadas en los diseños de cebadores oligonucleotídicos y sondas.

Como se utiliza en esta memoria, el término "una sonda oligonucleotídica" se refiere a un oligómero o polímero utilizado en la detección de un ácido nucleico diana que forma una estructura de dúplex u otro complejo con el ácido nucleico diana, basado en la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el ácido nucleico diana. Los cebadores y sondas oligonucleotídicos de la descripción pueden estar "modificados" o contener "modificaciones estructurales".

Las "modificaciones estabilizadoras de dúplex" se refieren a modificaciones estructurales, que cuando están presentes en los ácidos nucleicos proporcionan efectos de estabilización de dúplex cuando se comparan en términos de estabilidad térmica, medida usualmente como T_m , con los complejos de ácido nucleico respectivos que no tienen modificación estructural alguna, v.g., constituidos por nucleótidos naturales.

La expresión "nucleósidos naturales" como se utiliza en esta memoria, se refiere a cuatro desoxinucleósidos que pueden encontrarse comúnmente en los DNAs aislados de fuentes naturales. Los nucleósidos naturales son

desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, y desoxitimidina. El término abarca también sus homólogos de ribosa, con uridina en lugar de timidina.

5 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "nucleósidos no naturales" se refiere a análogos de nucleósidos que son diferentes en su estructura de los nucleósidos naturales para los polímeros de DNA y RNA. Algunos de los ácidos nucleicos de interés existentes naturalmente pueden contener nucleósidos que son estructuralmente diferentes de los nucleósidos naturales arriba definidos; por ejemplo, los DNAs de eucariotas pueden incorporar 5-metil-citosina y los tRNAs albergan ciertos análogos de nucleósido. Sin embargo, como se utiliza en aspectos particulares en esta memoria, la expresión "nucleósidos no naturales" abarca no obstante estas modificaciones de nucleósidos aun cuando las mismas pueden encontrarse en fuentes naturales. Por ejemplo, la ribotimidina se trata
10 en esta memoria como un nucleósido no natural.

"Mejorado", o "propiedades de hibridación mejoradas" de un polinucleótido, como se utiliza en esta memoria, se refiere a las propiedades de hibridación mejoradas resultantes de la práctica de la presente invención. Por ejemplo, el uso de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en ensayos de la presente invención conduce a la síntesis de un cDNA modificado en el que se dice que este cDNA modificado tiene propiedades de hibridación mejoradas. Esto significa que la estabilidad térmica o T_m de un complejo complementario de este DNA modificado con, por ejemplo, sondas o cebadores oligonucleotídicos, es mayor que la de un DNA que comprende bases naturales respectivas.
15

La "temperatura de fusión" o " T_m " se refiere a la temperatura a la cual un complejo complementario de ácidos nucleicos, usualmente bicatenario, llega a semi-disociarse en cadenas simples. Estos términos se utilizan también en la descripción de las estabildades de estructuras secundarias de polinucleótidos en donde dos o más fragmentos del mismo polinucleótido interaccionan de una manera complementaria uno con otro formando complejos, v.g., estructuras semejantes a horquilla, etc. Una estimación simple del valor T_m puede calcularse utilizando la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G+C)$, cuando un ácido nucleico se encuentra en solución acuosa en NaCl 1 M. Cálculos más exactos pueden realizarse utilizando la termodinámica de pares de bases de un método de "vecinos más próximos" (Breslauer K.J. et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3746-3750; SantaLucia J. Jr. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:1460-1465).
20
25

El término "etiqueta" se refiere a cualquier átomo o molécula que puede utilizarse para proporcionar una señal detectable y que puede estar unido a un ácido nucleico u oligonucleótido. Las etiquetas incluyen, pero sin carácter limitante, isótopos, radioetiquetas tales como ^{32}P ; restos de fijación tales como biotina; haptenos tales como dioxigenina; luminógenos, marcadores de masas; restos fosforescentes o fluorescentes, tintes fluorescentes solos o en combinación con otros tintes o restos que pueden suprimir o cambiar los espectros de emisión por efecto FRET. Las etiquetas pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática, espectrometría de masas, afinidad de fijación y análogos. Una etiqueta puede ser un resto cargado o, alternativamente, puede tener carga neutra. Las etiquetas pueden incluir o estar constituidas por secuencias de ácido nucleico o proteína, con tal que la secuencia que comprende la etiqueta sea detectable.
30
35

Una "mezcla de reacción" se refiere generalmente a una solución que contiene las sustancias reaccionantes necesarias para realizar una reacción de transcripción inversa, reacción de amplificación y/o reacción de detección, que, además de los componentes principales tales como ácidos nucleicos diana, DNA-polimerasas, cebadores oligonucleotídicos, sondas u otros componentes oligonucleotídicos, puede incluir también opcionalmente agentes de detección, enzimas especiales, nucleósido-5'-trifosfatos que incluyen los modificados, agentes tampón para mantener el pH a un nivel seleccionado durante una reacción, sales, co-factores y aditivos, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, glicerol, poli(etilen-glicol), dimetil-sulfóxido o formamida, y análogos.
40

Como se utiliza en esta memoria, el término "kit" se refiere a cualquier sistema para suministro de materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, tales sistemas de suministro incluyen elementos que permiten el almacenamiento, transporte y/o suministro de componentes de reacción tales como oligonucleótidos, componentes tampón, aditivos, mejoradores de reacción, enzimas y análogos en los recipientes apropiados de una localización a otra provistos comúnmente de instrucciones escritas para la realización del ensayo. Los kits pueden incluir uno o más recintos o cajas que contienen los reactivos de reacción relevantes y materiales de soporte. El kit puede comprender dos o más recipientes separados en donde cada uno de dichos recipientes incluye una porción de los componentes totales del kit. Los recipientes pueden suministrarse al receptor destinado juntos o por separado.
45
50

Síntesis del cDNA modificado mediada por transcripción inversa

Como se ha indicado arriba, un aspecto importante de la presente invención se refiere a la síntesis de cDNA modificado por transcripción inversa de una secuencia diana de RNA. La transcripción inversa es un proceso bien conocido por el cual una enzima DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa cataliza la síntesis dependiente de un molde de DNA complementario (cDNA). Una secuencia diana de RNA de interés puede convertirse en una reacción de transcripción inversa en heterodúplex cDNA/RNA o en cDNA dúplex, por ejemplo como se describe en Simpson D. et al (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 151:487-492; Belyavsky A. et al (1989) Nucleic Acids Res., 17: 2919-2932, y muchas otras referencias. Estos métodos están
55

basados en transcriptasas inversas que extienden un cebador oligonucleotídico hibridado a un RNA molde en presencia de desoxinucleósido-5'-trifosfatos (dNTPs).

Se ha encontrado, conforme a la presente invención, que las enzimas transcriptasa inversa pueden adoptar y utilizar como sustratos dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex y, adicionalmente, que la incorporación de tales dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex en cDNA durante la transcripción inversa proporciona propiedades de hibridación mejoradas y, como resultado, eficiencia y sensibilidad mejoradas en la detección subsiguiente de secuencias diana basada en amplificación. Así pues, conforme a la presente invención, se proporcionan métodos mejorados para la detección de secuencias de RNA basada en amplificación, particularmente secuencias de RNA pequeñas (v.g. miRNA o siRNA), por síntesis de cDNAs modificados que contienen dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex.

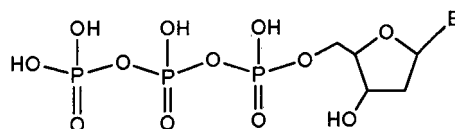
cDNAs modificados de la invención que tienen propiedades de hibridación mejoradas se producen por realización de reacciones de transcripción inversa en presencia de una DNA-polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa (v.g., una transcriptasa inversa) y una mezcla de dNTPs que comprende al menos un dNTP y con frecuencia más de uno modificado en la base y estabilizador de dúplex. Una reacción de transcripción inversa de la invención puede incluir la totalidad de los cuatro dNTPs naturales (dTTP, dCTP, dATP y dGTP) con la condición de que uno o más de los dNTPs naturales está sustituido parcial o completamente con un dNTP respectivo modificado en la base y estabilizador de dúplex.

dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex útiles en los métodos de esta invención incluyen, pero sin carácter limitante, análogos de dNTP que actúan como sustratos para una enzima DNA-polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa y que catalizan la síntesis de una secuencia de cDNA que tiene estabilidad de dúplex mejorada como resultado de la incorporación de los análogos de dNTP de esta invención.

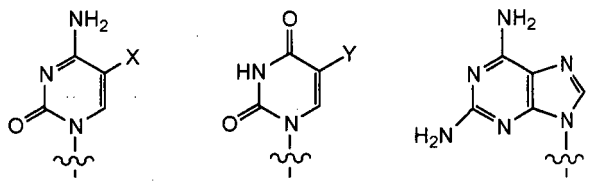
Ciertos dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex ilustrativos de la presente invención contienen 2--desoxi-D-ribosa en la que la base del nucleótido está modificada. Tales análogos de nucleósido pueden sintetizarse aplicando técnicas de química orgánica bien conocidas que se ilustran v.g. en Townsend L.B., editor (1988) Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, NY. Pueden obtenerse 5'-trifosfatos respectivos utilizando protocolos descritos v.g. en Vaghefi M., ed. (2005). Nucleoside Triphosphates and their Analogs: Chemistry, Biochemistry, and Biological Applications, Taylor & Francis. Los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex de la presente invención incluyen ciertos dNTPs que pueden obtenerse de fuentes comerciales, por ejemplo, Trilink (California, EE.UU.).

Otros dNTPs ilustrativos modificados en la base y estabilizadores de dúplex utilizados en la invención incluyen, por ejemplo, pirimidinas que están sustituidas en la posición 5 y que son sustratos para una enzima transcriptasa inversa.

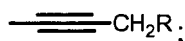
En otras realizaciones, un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex utilizado en la invención tiene la fórmula:



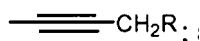
donde B se selecciona de:



X se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃ o



Y se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I o



y

R es -H, -OH, -OCH₃ o -NH₂.

En una realización más particular, un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex utilizado en los métodos de esta invención se selecciona de d(2-amA)TP, d(5-PrU)TP, d(5-PrC)TP, o una combinación de los mismos.

Las personas con experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que pueden aplicarse ciertos ajustes o variaciones de los métodos en el uso de los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex, dependiendo de la naturaleza de una reacción de amplificación particular, particularmente las que comprenden enzimas distintas de DNA-polimerasa (endonucleasas de restricción, RNA-polimerasas, etc.). Los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex no interferirán preferiblemente con otras actividades enzimáticas donde los mismos son componentes fundamentales de la reacción o síntesis de DNA. Esto puede dictar la elección de los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex a utilizar en un esquema de amplificación particular, y la elección puede hacerse basada en las propiedades de estas enzimas, que son bien conocidas en la técnica.

Amplificación de ácido nucleico del cDNA modificado

El cDNA modificado sintetizado como se ha descrito arriba puede interactuar con al menos un y preferiblemente más de un cebador oligonucleotídico o sonda durante las manipulaciones subsiguientes (v.g., reacciones de amplificación) para formar complejos de hibridación que tienen estabilidad mejorada en virtud del cDNA modificado de la invención que tiene propiedades de hibridación mejoradas comparado con un cDNA que no se ha modificado con análogos de bases estabilizadores de dúplex. Como resultado, los cebadores o sondas que se hibridan al cDNA modificado durante las reacciones de amplificación subsiguientes, por ejemplo, proporcionan sensibilidad, eficiencia, rendimiento, etc., mejorados como resultado de sus propiedades de hibridación mejoradas.

Por tanto, conforme a otro aspecto de la invención, después de la transcripción inversa de una secuencia diana para producir un cDNA modificado, como se ha descrito arriba, se realiza una reacción de amplificación del ácido nucleico a fin de aumentar el número de copias de la secuencia diana. En una realización preferida, la amplificación de los ácidos nucleicos diana se realiza utilizando la "reacción en cadena de polimerasa" ("PCR") (Mullis K.B. et al., Patente U.S. No. 4.683.195; Mullis K.B., Patente U.S. No. 4.683.202). El perfil PCR utilizado más frecuentemente emplea dos cebadores oligonucleotídicos, uno para cada cadena, que están diseñados de tal modo que la extensión de un cebador proporciona un molde para el otro cebador en el ciclo PCR siguiente. Generalmente, una PCR consiste en la repetición (o ciclos) de (i) un paso de desnaturalización que separa las cadenas de un ácido nucleico bicatenario que comprende una secuencia diana, seguido por (ii) un paso de reasociación que permite que los cebadores se reasocien a posiciones que flanquean la secuencia diana; y (iii) un paso de extensión que extiende los cebadores en una dirección 5' a 3', formando de este modo un ácido nucleico 'amplicón' que tiene secuencias complementarias a la secuencia diana. Cada uno de los tres pasos anteriores puede conducirse a una temperatura diferente utilizando un *termociclador automático*. Los ciclos PCR pueden repetirse tantas veces como se desee, dando como resultado, al menos en teoría, una acumulación exponencial de un fragmento de DNA diana cuyos términos están definidos por los extremos 5' de los cebadores utilizados. Las temperaturas y los tiempos de incubación particulares en cada paso, así como las tasas de cambio entre los pasos dependen de muchos factores bien conocidos por quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica relevante, y ejemplos relevantes pueden encontrarse en numerosos protocolos publicados; por ejemplo, McPherson M.J. et al. (1991 y 1995) y análogos. Aunque las condiciones de la PCR pueden variar dentro de un amplio intervalo, en una PCR convencional, un ácido nucleico diana bicatenario se desnaturaliza generalmente a temperatura > 90°C, los cebadores se reasocian a una temperatura comprendida en el intervalo 50-75°C, y la extensión se realiza generalmente en el intervalo 72-78°C. Es también bien conocido que pueden realizarse reacciones PCR en las cuales la reasociación y la extensión se combinan en un solo paso.

Una orientación adicional para realización de las reacciones PCR puede encontrarse, por ejemplo, en Clementi M. et al (1993) PCR Methods Appl., 2: 191-196; Clegg R.M. (1992) Methods Enzymol., 211:353-388; Clementi M. et al (1993) PCR Methods Appl., 2: 191-196; Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) Curr. Opin. Biotech., 9: 43-48; Livak K.J. et al (1995) PCR Methods and Applications, 4: 357-362; McPherson M.J. et al, eds (1991) PCR: A Practical Approach. IRL Press, Oxford; McPherson M.J. et al, eds (1995) PCR2: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, y muchos otros manuscritos citados en esta memoria.

Existen numerosas técnicas de amplificación de ácido nucleico, además de la PCR, que son conocidas y están disponibles en la técnica, muchas de las cuales pueden aplicarse fácilmente para uso conforme a la presente invención.

Un método de amplificación es la amplificación con desplazamiento de cadena (Walker, G. et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396; Walker *et al.*, "Nucleic Acid Target Generation," U.S. Pat. No. 5,270,184; Walker, "Strand Displacement Amplification," U.S. Pat. No. 5,455,166; y Walker et al. (1992) Nucleic Acids Research 20, 1691-1696), a la que se hace referencia comúnmente como SDA, que utiliza ciclos de pares de reasociación de secuencias cebadoras a cadenas opuestas de una secuencia diana, extensión de cebadores en presencia de un dNTP para dar lugar a un producto de extensión de cebadores dúplex con hemifosforotioato, mellado mediado por endonucleasas de un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción hemimodificadas, y extensión de cebadores mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la mella para desplazar una cadena existente y producir una cadena para la tanda siguiente de reasociación de cebadores, mellado y desplazamiento de cadena, dando como resultado la amplificación geométrica del producto. La SDA termófila (tSDA) utiliza endonucleasas y

polimerasas termófilas a mayores temperaturas esencialmente por el mismo método (Patente Europea No. 0684315).

Otros métodos de amplificación ilustrativos incluyen: amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (Malek et al., Patente U.S. No. 5.130.238), a la que se hace referencia comúnmente como NASBA; uno que utiliza una RNA-replicasa para amplificar la molécula sonda propiamente dicha (Lizardi, P. et al. (1988) *Bio Technol.* 6, 1197-1202), a la que se hace referencia comúnmente como replicasa Q β ; un método de amplificación basado en transcripción (Kwoh, D. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177); replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, J. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874-1878; Landegren (1993) *Trends in Genetics* 9, 199-202; and Lee, H. et al., *NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGIES* (1997)); y amplificación mediada por transcripción (Kacian *et al.*, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods," U.S. Pat. No. 5,480,784; y Kacian et al., U.S. Pat. No. 5,399,491), a la que se hace referencia comúnmente como TMA. Para discusión adicional acerca de métodos de amplificación conocidos véase Persing, David H., 1993, "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" en *Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al., Eds.), pp. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC). Otros métodos ilustrativos adicionales de amplificación incluyen amplificación en círculo rodante (RCA) (Lizardi, "Rolling Circle Replication Reporter Systems," U.S. Pat. No. 5,854,033); Amplificación Dependiente de Helicasa (HDA) (Kong *et al.*, "Helicase Dependent Amplification Nucleic Acids," U.S. Pat. Appln. Pub. No. US 2004-0058378 A1); and Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) (Notomi *et al.*, "Process for Synthesizing Nucleic Acid," U.S. Pat. No. 6,410,278).

Las DNA-polimerasas son obviamente componentes clave en la práctica de la amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención. DNA-polimerasas útiles conforme a la invención incluyen tanto polimerasas naturales como mutantes de polimerasa, que carecen de la actividad de exonucleasa 5' a 3' y/o 3' a 5'. Las polimerasas de ácido nucleico pueden poseer grados diferentes de termoestabilidad. La elección de DNA-polimerasa viene determinada por muchos factores que conciernen usualmente a la elección de las reacciones de amplificación y detección aplicadas en la invención. En ciertas realizaciones, una DNA-polimerasa exhibe preferiblemente actividad de desplazamiento de cadena a la temperatura a la que aquélla puede extender un cebador oligonucleotídico. En muchos casos de amplificación isotérmica en la que la amplificación de DNA está basada en el desplazamiento de una de las cadenas de DNA, por ejemplo, en las amplificaciones SDA y de Círculo Rodante, una DNA-polimerasa carece preferiblemente de actividad de exonucleasa 5' a 3'. Las DNA-polimerasas pueden aislarse de diversas fuentes naturales que incluyen enzimas de bacteriófago, arqueobacterias, eubacterias, y eucariotas.

Enzimas disponibles comercialmente que carecen de ambas actividades de exonucleasa 5' a 3' y 3' a 5' incluyen Sequenasa (exo-T7; USB), Pfu exo- (Stratagene), exo-Vent (Nueva England BioLabs), exo-DeepVent (Nueva England BioLabs), fragmento exo-Klenow (Stratagene), Bst (Bio-Rad), Isotherm (Epicentre), fragmento Stoffel (Perkin-Elmer), ThermoSequenase (USB), y TaqFS (Hoffman-LaRoche). Ejemplos de DNA-polimerasas termoestables que son útiles para ensayos de detección PCR incluyen, pero sin carácter limitante, las DNA-polimerasas Pfu, Taq, Vent, Deep Vent y UITma y otras polimerasas de las especies *Thermus* o de *Thermotoga* marítima. Las polimerasas termoestables para la detección por PCR mantienen preferiblemente actividad a temperatura > 90°C y más preferiblemente a > 100°C. Ciertas reacciones de detección, por ejemplo, los ensayos TaqMan, requieren el uso de DNA-polimerasas que expresan actividad de exonucleasa 5' a 3'. En los ejemplos que se proporcionan en esta memoria se utilizó DNA-polimerasa JumpStart de Sigma.

Dependiendo de la elección de la reacción de amplificación del DNA, los componentes de la reacción de la invención pueden variar. Además de los componentes principales, las reacciones y mezclas de reacción de la invención pueden incluir, pero sin carácter limitante, agentes de detección, enzimas especiales, (v.g. nucleasas, endonucleasas FEN, endonucleasas de restricción, RNAsas, con inclusión de RNAsa H, RNA-polimerasas, helicasas, etc.), agentes tampón para mantener el pH a un nivel seleccionado durante una reacción, sales, co-factores y aditivos, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, glicerol, poli(etilen-glicol), dimetil-sulfóxido (DMSO) o formamida y análogos.

Los cebadores oligonucleotídicos inician la síntesis y amplificación de cDNAs modificados en las reacciones de amplificación de la presente invención. Los cebadores oligonucleotídicos pueden existir naturalmente, como en un material digerido por restricción purificado o pueden producirse por síntesis. Los cebadores oligonucleotídicos de la invención tienen que ser suficientemente complementarios para hibridarse con una cadena molde a fin de que tenga lugar la elongación del cebador en presencia de una DNA-polimerasa. La secuencia de los cebadores oligonucleotídicos no precisa reflejar la secuencia exacta de los ácidos nucleicos diana con los que están diseñados para hibridarse con tal que los mismos sean suficientemente complementarios para hibridarse a ella y participar en la extensión del cebador. Por ejemplo, un fragmento nucleotídico no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementario a la cadena. Bases no complementarias o secuencias más largas pueden intercalarse dentro del cebador, con tal que la secuencia del cebador tenga complementariedad suficiente con la secuencia del molde para hibridarse y formar con ello un complejo molde-cebador para síntesis del producto de extensión del cebador oligonucleotídico. El diseño de cebadores puede estar guiado por la reacción de amplificación particular que se utilice. Por ejemplo, los cebadores diseñados para amplificación SDA incorporan una secuencia de una endonucleasa de restricción que soporta la reacción de amplificación, v.g., Walker G.T. et al, Patente US No. 5,270,184; Dattagupta N. et al, Patente US No.

6,214,587; Walker G.T. et al (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24:384-353; Walker G.T. et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396; Spargo C.A. et al (1996) *Molecular and Cellular Probes*, 10:247-256.

Los cebadores oligonucleotídicos pueden contener modificaciones estructurales tales como átomos, restos, residuos, polímeros, enlazadores que son usualmente de naturaleza sintética y que no están presentes comúnmente en los ácidos nucleicos naturales. Los cebadores oligonucleotídicos pueden incorporar una etiqueta detectable, por ejemplo, isótopos, radioetiquetas tales como ³²P, restos de ligación tales como biotina, haptenos tales como dioxigenina, luminógenos, marcadores de masa, restos fosforescentes o fluorescentes, tintes fluorescentes y análogos. Dado que los cebadores se incorporan usualmente durante la amplificación del DNA, la etiqueta puede utilizarse para detectar los DNAs modificados en la presente invención. Los cebadores oligonucleotídicos pueden incorporar también análogos de nucleósidos o nucleótidos que están presentes rara vez en los ácidos nucleicos naturales, con inclusión, pero sin carácter limitante, de inosina (hipoxantina), 5-bromouracilo, 5-metilcitosina, 5-yodouracilo, 2-aminoadenosina, 6-metiladenosina, pseudouridina y análogos.

En ciertas realizaciones, los cebadores oligonucleotídicos incorporan modificaciones estructurales que proporcionan efectos estabilizadores de dúplex. Sin embargo, en todos los aspectos de la invención, el extremo 3' de los cebadores no tiene que estar bloqueado de manera que impida la iniciación de la síntesis del DNA. Ejemplos de modificaciones estructurales que pueden utilizarse en el diseño de los cebadores oligonucleotídicos incluyen, pero sin carácter limitante, ligantes de la hendidura menor (MGB) (Afonina I. et al (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 2657-2660) que están acoplados usualmente al extremo 5' y ciertos análogos de nucleótidos. Ejemplos de los análogos de nucleótidos incluyen bases "universales" (Burgner D. et al (2004) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23: 755-765) y "ácidos nucleicos bloqueados" ("LNA") (Latorra D. et al/ (2003) *Mol. Cell. Probes*, 17: 253-259; Latorra D. et al (2003) *Hum. Mutat.*, 22:79-85; Di Giusto D.A. y King G.C. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32: e32). Cierta número de los análogos de nucleótidos modificados en la base son bien tolerados por las DNA-polimerasas, y estos análogos pueden utilizarse en diseño de cebadores. Ejemplos de tales análogos de nucleótidos modificados en la base incluyen, pero sin carácter limitante, 5-metil-citosina y 2,6-diaminopurina (Lebedev Y. et al. (1996) *Genet. Anal.*, 13, 15-21).

Los cebadores oligonucleotídicos pueden estar etiquetados y pueden utilizarse para amplificar un DNA modificado etiquetado. La etiqueta se utiliza en la etapa de detección del ácido nucleico. Una etiqueta preferida es una etiqueta fluorescente. En un aspecto, un cebador oligonucleotídico puede acoplarse con una sonda oligonucleotídica, v.g., el cebador Scorpion (Whitcombe D. et al (1999) *Nature Biotech.*, 17:804-807; Thelwell N. et al (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:3752-3761).

Las sondas oligonucleotídicas son oligómeros o polímeros capaces de formar estructuras dúplex u otros complejos con productos de transcripción inversa y/o amplificación, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en las sondas con secuencias respectivas en los DNAs modificados. Las sondas oligonucleotídicas de la presente invención pueden estar modificadas o contener modificaciones estructurales. Ciertas modificaciones están presentes comúnmente en las sondas oligonucleotídicas, y éstas están relacionadas usualmente con las etiquetas utilizadas en la detección del DNA. Los oligonucleótidos etiquetados fluorescentemente y, en particular, las sondas FRET son componentes de detección útiles. Cuando las sondas oligonucleotídicas y los cebadores se hibridan a un DNA modificado de la invención, los mismos forman complejos complementarios estabilizadores debido a las propiedades de hibridación mejoradas del DNA modificado. Al contrario que los cebadores oligonucleotídicos, las sondas oligonucleotídicas tienen pocos límites en términos de modificaciones estructurales. Esto es especialmente cierto para las tecnologías de sondas FRET activadas por hibridación. Por ejemplo, las sondas oligonucleotídicas pueden estar constituidas completamente por monómeros de PNA no naturales, v.g. Ortiz E. et al., (1998) *Mol. Cell. Probes*, 12: 219-226. El uso de los otros análogos de nucleótidos modificados en la base o modificados en el azúcar en los diseños de sondas como LNA es también aplicable en líneas generales (Johnson M.P. et al (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:e55; Simeonov A. y Nikiforov T.T. (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30:e91). Las sondas oligonucleotídicas pueden llevar un resto MGB conjugado a ambos extremos. Por ejemplo, las sondas FRET conjugadas a 5'-MGB no se escinden en la PCR de detección, y estas sondas proporcionan señal debido a un mecanismo de acción activado por hibridación como se describe en Vermeulen N. et al (2002) *J. Clin. Ligand Assay*, 25: 268-275. Las sondas FRET conjugadas a 3'-MGB no se bloquean por degradación de 5'-nucleasa, y estas sondas generan señal fluorescente debido a la escisión por la polimerasa Taq, como se ilustra en Kutuyavin I.V. et al (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28: 655-661.

Los cebadores y sondas oligonucleotídicos pueden sintetizarse utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Aunque los cebadores se pueden preparar, por ejemplo, por clonación y análisis de materiales digeridos por restricción de secuencias apropiadas, la síntesis química directa es un método preferido. Los oligonucleótidos se pueden preparar por un método de síntesis química adecuado, que incluye, por ejemplo, el método del fosfodiéster descrito en Brown E.L. et al (1979) *Methods Enzymol.*, 68: 109-151, o el método del fosfotriéster descrito en Narang S.A. et al (1979) *Methods Enzymol.*, 68: 90-98. Otro método es el método del dietilfosforamidato descrito en Beaucage S.L., Caruthers M.H. (1981) *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862, que puede utilizarse en combinación con el método del soporte sólido descrito en Caruthers M.H., Matteucci M.D. (1984), Patente U.S. No. 4.458.066 y realizarse utilizando uno de varios sintetizadores automáticos comerciales de oligonucleótidos.

Los cebadores y sondas oligonucleotídicos se diseñan generalmente conforme a reglas y especificaciones de una tecnología particular de amplificación o detección conocida en la técnica, con inclusión de las técnicas discutidas y citadas anteriormente. Se trata de ciertos requisitos comunes para los componentes oligonucleotídicos, por ejemplo, las propiedades de hibridación del oligonucleótido necesarias para acceder a la temperatura de una reacción particular, a la que se hace referencia usualmente como temperatura de fusión (T_m). T_m define una temperatura a la cual un complejo complementario de un componente oligonucleotídico con ácido nucleico diana llega a semi-disociarse en cadenas simples. Una estimación simple del valor T_m puede calcularse utilizando la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G+C)$, cuando un ácido nucleico se encuentra en solución acuosa en NaCl 1M. Cálculos más exactos pueden realizarse utilizando la termodinámica de pares de bases de un método de "vecinos más próximos" (Breslauer K.J. et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3746-3750; SantaLucia J. Jr. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 1460-1465). Programas comerciales, que incluyen OligoTM, Primer Design y programas disponibles en internet, que incluyen Primer3 y Oligo Calculator pueden utilizarse también para calcular un valor T_m de una secuencia de ácido nucleico útil conforme a la invención. Programas comerciales, v.g. Visual OMP (software de DNA), Beacon Designer 7.00 (Premier Biosoft International), pueden utilizarse en el diseño de ensayos en tiempo real con SYBR Green, TaqMan y el sistema de detección de balizas moleculares para reacciones de amplificación basadas en PCR y NASBA. En general, los valores T_m de las sondas oligonucleotídicas son 5-7°C más altos que el valor T_m de los cebadores de amplificación correspondientes.

Adicionalmente, como se requiere por ciertos esquemas de amplificación, una mezcla de reacción de la invención puede incorporar también análogos de dNTP distintos de los dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex. Por ejemplo, la amplificación SDA, descrita en Walker G.T. et al (1993), Patente US No. 5.270.184, requiere el uso de un análogo de α -tio-NTP para promover la mella de una cadena de DNAs bicatenarios. La desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) es otro ejemplo más. Aunque se sabe que esta modificación de la base desestabiliza los dúplex de DNA, el uso selectivo de tales DNAs modificados está también dentro del alcance de la presente invención. El propósito principal de dUTP en este caso es prevenir arrastres de contaminación de muestra a muestra, como se describe en Gelfand D.H. et al (1995) Patente US No. 5.418.149.

Detección de los productos de amplificación

El DNA amplificado de la invención puede detectarse por cualquier medio físico, químico o biológico con inclusión, pero sin carácter limitante, de fuerza eléctrica (v.g., electroforesis), gravedad (v.g., sedimentación), espectroscopia (v.g., radio-espectroscopia, UV, espectroscopia de masas, fluorescencia, quimioluminiscencia, quimiofluorescencia, etc.), absorción, magnetismo, cromatografía (HPLC, de fase inversa, de intercambio iónico, de exclusión por volumen, etc.), reacciones con proteínas (restringidasas, endonucleasas, polimerasas, quinasas y otras actividades enzimáticas), afinidad de fijación y análogos. En ciertas realizaciones, los productos de amplificación se etiquetan durante o poco después de la etapa de amplificación y la etiqueta se utiliza en la detección de los productos de amplificación. Etiquetas ilustrativas incluyen, pero sin carácter limitante, isótopos, radioetiquetas tales como ³²P, restos de fijación tales como biotina, marcadores luminógenos y de masa, restos fosforescentes o fluorescentes, y tintes fluorescentes solos o en combinación con otros tintes o restos que pueden suprimir o cambiar los espectros de emisión por un efecto FRET.

En otras realizaciones, los productos de amplificación pueden detectarse utilizando un agente de detección durante la reacción de amplificación (en tiempo real) o después. Ciertos agentes de detección preferidos son tinte de intercalación y agentes fluorescentes, v.g. bromuro de etidio. Por ejemplo, los productos de amplificación en PCR pueden detectarse utilizando tintes de intercalación como se describen por Wittwer C.T. et al en las Patentes US Nos. 6,174,670 y 6,569,627, y en Higuchi R. et al (1992) Biotechnology, 10:413-417; Higuchi R. et al (1993) Biotechnology, 11:1026-1030. Ciertos agentes fluorescentes ilustrativos incluyen moléculas que cambian sus propiedades de fluorescencia después de la interacción con ácidos nucleicos, proporcionando así una señal detectable. SYBR Green I y II de Invitrogen son ejemplos de tales agentes fluorescentes, como se describe en Schneeberger C. et al (1995) PCR Methods Appl., 4: 234-238 y Mackay J., Landt O. (2007) Methods Mol. Biol., 353: 237-262.

En ciertos aspectos, la detección de los productos de amplificación se realiza en "*tiempo real*". La amplificación en tiempo real es posible cuando todos los componentes de detección están disponibles durante la amplificación de la diana, y las condiciones de reacción (v.g., temperatura, agentes tampón, sales, co-factores, agentes de barrido, y análogas) soportan ambas etapas de la reacción - amplificación y detección, permitiendo con ello que un ácido nucleico diana se mida a medida que progresa la reacción de amplificación, reduciendo el número de pasos de manipulación subsiguientes requeridos para la detección de material amplificado. Por tanto, el término "PCR en tiempo real", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una PCR en la cual la cantidad de producto de reacción, v.g., el ácido nucleico diana amplificado, se monitoriza a medida que transcurre la reacción. La PCR en tiempo real difiere fundamentalmente en las químicas de detección para monitorización de la amplificación del ácido nucleico diana en la reacción, por ejemplo: Gelfand et al, en la Patente US No. 5,210,015, describen el uso de sondas FRET ("TaqMan") escindibles por 5'-nucleasa; Tyagi et al, in Patentes US No. 5,925,517, describen el uso de sondas FRET activadas por hibridación ("Balizas"). Revisiones de las químicas de detección para PCR de tiempo real pueden encontrarse también en Didenko V.V. (2001) BioTechniques, 31: 1106-1121; Mackay I.M. et al (2002) Nucleic Acids Res., 30 1292-1305, y Mackay J., Landt O. (2007) Methods Mol. Biol., 353 237-262.

Los productos de amplificación pueden detectarse también utilizando sondas oligonucleotídicas. Las sondas oligonucleotídicas interactúan con el DNA de una manera específica de la secuencia formando un complejo (v.g. dúplex complementario) y puede hacerse que este complejo sea más estable en virtud de los métodos de esta memoria, en caso deseado. En general, la estabilidad del complejo determina la sensibilidad de la detección. Por tanto, la estabilización del complejo entre una sonda oligonucleotídica y DNA modificado puede favorecer el ensayo de detección de diversas maneras.

En otra realización, la sonda oligonucleotídica incorpora una etiqueta, utilizándose esta etiqueta en la detección del DNA modificado de la invención. En una realización, esta etiqueta es una etiqueta fluorescente y se utiliza para detectar el DNA modificado por una técnica de polarización por fluorescencia. En otra realización, la sonda oligonucleotídica es una sonda FRET. La aplicación de sondas FRET en la detección de DNAs modificados, por ejemplo, puede proporcionar ventajas en la realización del ensayo de detección en tiempo real y la medición de la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. Cuando la reacción de amplificación es PCR, el tipo del ensayo se conoce como "PCR cuantitativa". La sonda FRET contiene comúnmente dos cromóforos. El cromóforo 'aceptor' puede ser un tinte no fluorescente seleccionado para extinguir la fluorescencia del fluoróforo 'informador' (Eftink S.R. (1991) en Lakowicz J.R. (editores), Topics in Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, Nueva York, V. 2:53-126). La formación de híbridos específicos de secuencia entre ácido nucleico diana y sondas conduce a un cambio en las propiedades de fluorescencia de la sonda, proporcionando detección de la diana de ácido nucleico. Los ensayos basados en FRET de tiempo real son muy adecuados, en particular, para diagnósticos clínicos. Al contrario de los tintes de intercalación y agentes fluorescentes (v.g. bromuro de etidio, SYBR Green), esta detección es específica de la secuencia, eliminando virtualmente los resultados positivos falsos.

Muchas estrategias de detección que aprovechan el efecto FRET han sido consignadas. Una estrategia FRET es un método de *sonda FRET activada por hibridación*, que está basado en el cambio de distancia entre los tintes donante y aceptor como resultado de la formación de un complejo específico de la secuencia entre un ácido nucleico diana y una sonda oligonucleotídica fluorescente. Por ejemplo, el método Adjacent Hybridization Probe utiliza dos sondas oligonucleotídicas que se hibridan a secuencias adyacentes de DNA diana como se describe en v.g. Eftink M.R. (1991) en Lakowicz J.R. (ed.), Topics in Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, Nueva York, V.2:53-126; Heller M.J. y Morrison L.E. (1985) en Kingsbury, D.T. y Falkow, S. (eds.), Rapid Detection and Identification of Infectious Agents. Academic Press, Nueva York, 245-256; Cardullo R.A. et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8790-8794. Cada una de las sondas está marcada con tintes de pares FRET en los extremos apropiados de la sonda, de tal modo que cuando ambas sondas se hibridan a un DNA diana, los fluoróforos donante y aceptor se encuentran en proximidad espacial suficiente para permitir una FRET detectable.

Un método alternativo utiliza sondas fluorescentes extinguidas que se aclaran durante la PCR (v.g. Patente U.S. No. 5.804.375). Estas sondas incluyen restos fluorescentes informador y extintor conjugados a la misma sonda. Debido al arrollamiento en serpentín del oligonucleótido aleatorio, el resto extintor está suficientemente próximo al tinte informador para extinguir su fluorescencia. Una vez que la sonda se hibrida a una diana oligonucleotídica complementaria, los restos extintor e informador se separan, permitiendo así que el tinte informador emita fluorescencia. Los problemas de ruido de fondo asociados a menudo con este método pueden resolverse sintetizando el oligonucleótido con una cadena principal de PNA flexible, v.g. Ortiz E. et al (1998) Mol. Cell. Probes, 12: 219-226.

Alternativamente, puede realizarse una detección FRET eficiente utilizando *Balizas Moleculares*, sondas oligonucleotídicas en forma de horquilla en las cuales los tintes FRET se encuentran en proximidad estrecha por formación de tallo intramolecular, v.g. Tyagi S. y Kramer F.R. (1996) Nat. Biotechnol., 14: 303-308; Bonnet G. et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 6171-6176; Tyagi S. et al (2000) Nat. Biotechnol., 18: 1191-1196; Marras S.A.E. et al (2002) Nucleic Acids Res., 30: e122. Las metodologías de baliza molecular tienen un ruido de fondo de fluorescencia notablemente bajo. Estas sondas son muy adecuadas para uso en PCR de tiempo real como se describe, v.g., en Piatek A.S. et al (1998) Nat. Biotechnol., 16: 159-363; Lewin S.R. et al (1999) J. Virol., 63: 6099-6103.

La unión covalente de una sonda de baliza molecular a un cebador PCR es una propiedad singular de *los Cebadores Scorpion*, v.g. Whitcombe D. et al (1999) Nature Biotech., 17: 804-807; Thelwell N. et al (2000) Nucleic Acids Res., 28: 3752-3761. En los 'Scorpions', el extremo 5' de un cebador PCR está conjugado al extremo 3' de una baliza molecular a través de un enlazador flexible largo. El enlazador no es un molde para DNA-polimerasa, impidiendo así la extensión a lo largo de la secuencia baliza. La parte genómica de la baliza molecular está diseñada para fijarse a un producto de extensión direccionado del cebador al cual está unida covalentemente la sonda. Al contrario que los Cebadores Moleculares, la etapa de detección de DNA en Scorpions se convierte en una reacción *intra*-molecular. Esto favorece la resolución de otro problema adicional de la tecnología de balizas asociado con la cinética lenta de la hibridación.

Las *sondas eclipse* son otro ejemplo adicional de sondas FRET basadas en hibridación que tienen ruido de fondo por fluorescencia bajo (Afonina I. A. et al (2002) Biotechniques, 32: 940-949). El diseño de la sonda Eclipse incluye un resto de fijación en la hendidura menor (MGB) en el extremo 5' además de dos tintes FRET, uno de los cuales es un extintor no fluorescente u oscuro. Debido a los fuertes efectos estabilizadores del dúplex de DNA del resto MGB, como se expone en Kutayavin I.V. et al (1997), Nucleic Acids Res., 25: 3718-3723, las sondas pueden diseñarse tan

cortas como 12-20-meros al tiempo que mantienen todavía las propiedades de hibridación requeridas para la detección por PCR de tiempo real. La ubicación de la cola MGB en el extremo 5' de las sondas bloquea por completo la escisión por la 5'-nucleasa y la señal fluorescente se genera debido exclusivamente a la separación del tinte activada por hibridación.

- 5 El mecanismo de la anulación de la FRET por distanciamiento de los tintes FRET tiene ciertos límites. Es difícil, por ejemplo, anular por completo el efecto FRET, y las sondas tienen que ser como mínimo 20-24-meros. En los dúplex sonda-diana cortos de 8-12 pb, la extinción "residual" puede alcanzar tanto como 20-50% (Cardullo R.A. et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8790-8794). Además, el tinte informador puede ser extinguido parcialmente por bases próximas, en particular, por guaninas con indiferencia de la poca superposición espectral. Este efecto es bien conocido y ha sido utilizado en una tecnología de detección de DNA conocida por el nombre de *Cebadores Fluorógenos Auto-extinguidos*, o también *Cebadores LUX* (abreviatura de Light Upon Extension), e.g. Nazarenko I. et al (2002) Nucleic Acids Res., 30: e37; Nazarenko I. et al (2002) Nucleic Acids Res., 30: 2089-2195. La tecnología se comporta óptimamente con tintes "verdes" como fluoresceína (FAM). Sin embargo, los cebadores LUX no son específicos de la secuencia. Cualquier producto de una extensión de cebador LUX, con inclusión de dímeros de cebador, generará una señal fluorescente.

10 *Sondas FRET escindibles*. Una estrategia eficaz para anular la FRET está basada en la *escisión* de las sondas oligonucleotídicas después de su fijación a los ácidos nucleicos diana. La tecnología *TaqMan*TM se desarrolló como un método de detección de ácido nucleico en tiempo real y utiliza la actividad de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), v.g. Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) Curr. Opin. Biotech., 9: 43-48. Una sonda FRET etiquetada dual está diseñada para reasociarse a una secuencia diana localizada entre dos sitios de fijación de cebadores PCR. Durante la elongación de la cadena, la polimerasa Taq escinde la sonda que se hibrida aguas abajo de un sitio de cebador que libera el tinte informador del extintor, anulando así de modo *permanente e irreversible* la FRET., v.g. Livak K.J. et al (1995) PCR Methods and Applications, 4: 357-362. La escisión de la sonda *TaqMan*TM es irreversible y la señal generada en un ciclo PCR dado es una suma de señales generadas en dicho ciclo particular más todas las anteriores. Sin embargo, el ruido de fondo elevado de la fluorescencia de las sondas *TaqMan*TM "clásicas" eclipsa esta ventaja. La conjugación con un resto MGB en el extremo 3' conduce a una mejora significativa de este parámetro (Kutyavin I.V. et al (2000) Nucleic Acids Res., 28: 655-661). Las sondas MGB-*TaqMan*TM relativamente cortas de 12-18 meros tienen propiedades mejoradas de discriminación de SNP. Sin embargo, la tecnología *TaqMan*TM está todavía fuertemente ligada a la eficiencia de la PCR, mientras que las tecnologías *Cycling Probe* (CPT) son relativamente independientes.

20 *Tecnologías Cycling Probe (CPT)*. Las Tecnologías *Cycling Probe* (CPT) representan un sistema adicional de detección que puede utilizarse. Estas reacciones están basadas en la escisión continua de las sondas oligonucleotídicas que se fijan a un ácido nucleico diana de una manera específica de la secuencia. Una endonucleasa apropiada reconoce el complejo y escinde la sonda al tiempo que deja la cadena diana intacta y recicla la misma para la tanda de escisión siguiente. Si la sonda hibridada se escinde internamente, los productos de escisión forman híbridos más débiles que la sonda original y estos fragmentos de sonda se disocian de la cadena diana dejándola disponible para tandas adicionales de la reacción de escisión. El reciclo de la diana significa que puede escindirse más de una sonda por molécula diana. En las reacciones CPT, la señal es función de dos variables principales, concentración de diana y tiempo. Cuando la concentración de la diana es fija, la señal crece linealmente a lo largo del tiempo. Reflejando el progreso de reacción, la escisión se ralentiza y cesa finalmente cuando prácticamente todas las sondas CPT se han escindido. Se han consignado varios diseños de sistema. Un método está basado en el uso de sondas químicas DNA-RNA que son escindidas por la RNAsa H después de la fijación al DNA diana, como se describe en Fong W. et al (2000) J. Clin. Microbiol., 38: 2525-2500, Modruzan Z. et al (2000) Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 37: 45-50. Estas sondas de DNA están diseñadas para tener al menos 4-5 ribonucleótidos en el centro de la cadena oligonucleotídica. La RNAsa H escinde sólo la porción de RNA de la sonda hibridada, y el polinucleótido diana se recicla para hibridarse a otra molécula sonda no escindida. En condiciones apropiadas, esto conduce a una ciclación de la reacción de escisión de la sonda. El descubrimiento y aislamiento recientes de análogos termoestables de RNAsa H han permitido combinar esta tecnología de detección de DNA con la PCR, como ha sido descrito, por ejemplo, por Harvey J. J. et al (2004) Anal. Biochem. 333: 236-255. Las sondas FRET respectivas pueden obtenerse de Takara Bio.

35 Otro método de CPT está basado en la especificidad de sustrato de la Endonucleasa IV de *E. coli*, una endonucleasa AP que inicia la reparación de sitios abásicos y otras lesiones afines en el DNA. Una sonda y mejorador FRET pueden formar colectivamente un sustrato para la endonucleasa AP que simula un sitio abásico parcialmente degradado. La enzima reconoce este sustrato artificial y "pinza" la cola 3' de la sonda liberando con ello el tinte informador y anulando la FRET. Esta reacción puede realizarse en un modo de ciclación en el que se consigue un rendimiento elevado de sonda escindida a concentraciones de DNA diana nanomolares e incluso *sub-nanomolares*, como se describe en Kutyavin I.V. et al (2004) Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0101893.

40 En otra realización, puede emplearse el *ensayo de detección INVADER*TM. El mismo utiliza la actividad de solapamiento o 5'-endonucleasa de ciertas polimerasas para escindir dos oligonucleótidos parcialmente superpuestos después de su fijación a DNA diana. El ensayo *INVADER*TM consiste típicamente en dos reacciones de escisión cíclicas consecutivas. La enzima utilizada para proporcionar la reacción de escisión es *CLEAVASE*, una DNA-polimerasa con capacidades de síntesis sustancialmente reducidas o completamente eliminadas, v.g.,

Dahlberg J.E. et al (1997) Patentes US Nos. 5,691,142; 5,837,450; 5,846,717; 5,985,557; 5,994,069 6,001,567; 6,090,543; 6,348,314; 6,875,572; 6,913,881; así como en Schweitzer B. y Kingsmore S. (2001) Curr. Opin. Biotech., 12: 21-27. El sistema de detección es un ensayo muy eficiente de amplificación de señal que puede no requerir amplificación alguna previa del DNA diana. Sin embargo, la amplificación previa de los ácidos nucleicos es un método preferido en la aplicación del ensayo INVADER. La fluorescencia de fondo aumenta linealmente con el tiempo como resultado de la escisión inespecífica de la sonda casete. Adicionalmente, el ensayo requiere carga de DNA diana sustancial, v.g. Schweitzer B. y Kingsmore S. (2001) Curr. Opin. Biotech., 12: 21-27, cuando no se aplica la amplificación. Combinaciones de CPT con técnicas de amplificación de ácido nucleico proporcionan ventajas, v.g., como se describe para las sondas oligonucleotídicas con estructuras secundarias en Sorge J.A. (2001), Patente US No. 6.589.743.

Se comprenderá por una persona con experiencia ordinaria en las técnicas relevantes que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos, composiciones, mezclas de reacción y kits descritos en esta memoria son fácilmente evidentes a partir de la descripción de la invención contenida en esta memoria teniendo en cuenta la información conocida por el operario de experiencia ordinaria, y pueden realizarse sin desviarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma. Habiendo descrito ahora en detalle la presente invención, la misma se comprenderá más claramente por referencia a los ejemplos que siguen, que se incluyen en esta memoria únicamente para propósitos de ilustración y no deben entenderse como limitantes de la invención.

Ejemplos

Se proporcionan a continuación ejemplos que ilustran ciertos aspectos y realizaciones de la invención. Será apreciado por el operario experto que estos ejemplos no tienen por objeto limitar la invención a las realizaciones específicas aquí descritas. Adicionalmente, los expertos en la técnica, utilizando las tecnologías, materiales y métodos descritos en esta memoria, podrían idear y optimizar fácilmente sistemas alternativos de transcripción inversa y/o amplificación para realización de estos métodos y métodos afines, manteniendo sin embargo el espíritu y alcance de la presente invención.

En este ejemplo, se demuestra que las enzimas transcriptasa inversa pueden adoptar y utilizar como sustratos dNTPs modificados en la base, y que la incorporación de estos dNTPs modificados en la base en cDNA modificado da como resultado sensibilidad, eficiencia y rendimiento mejorados durante la amplificación subsiguiente del ácido nucleico. Así, conforme a la presente invención, se proporcionan métodos para detección mejorada basada en amplificación de secuencias de RNA por síntesis de cDNAs modificados durante la transcripción inversa en donde los cDNAs modificados tienen incorporados en ellos dNTPs modificados en la base.

1. Transcripción Inversa

El protocolo experimental utilizado para realizar la transcripción inversa se describe a continuación. Se realizaron experimentos en paralelo utilizando dNTPs naturales o modificados en la base. En los experimentos que utilizaron dNTPs modificados en la base, se utilizó una mezcla que comprendía 2,6-diaminopurina-desoxinucleósido-5'-O-trifosfato (al que se hace referencia también como d(2-amA)TP), 5-propinil-desoxiuridina-5'-O-trifosfato (al que se hace referencia también como d(5-PrU)TP), 5-propinil-desoxicitosina-5'-O-trifosfato (al que se hace referencia también como d(5-PrC)TP) y dGTP. Las mezclas de reacción se prepararon por mezcladura de soluciones stock apropiadas en las cantidades indicadas a continuación. Los cebadores directo e inverso, así como la secuencia del miRNA diana, se muestran en la Figura 1.

40 Transcripción Inversa:

<i>Mezcla de reacción:</i>	<i>Cantidad:</i>
Cebador RT (cebador inverso, 2 µm)	1 µl
RNA diana, miR-155 (10 ⁸ copias/µl)	0,5 µl
Mezcla 10X dNTPs (2 mM cada uno natural o modificado en la base)	5 µl
Agua	5,5 µl
Volumen total:	12 µl

La mezcla de reacción se calentó a 65°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. Se añadió luego lo siguiente:

Tampón de la primera cadena 5X (Invitrogen)	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
Agua	1 µl

El Tampón 5X de la Primera Cadena comprende: KCl 375 mM,
MgCl₂ 15 mM, DTT 0,1 M, Tris-HCl 250 mM (pH 8,3)

La mezcla de reacción se calentó a 45°C durante 2 minutos y se añadió luego 1 µl de SuperScript™ II RT (Invitrogen).

- 5 El perfil de temperatura utilizado en la reacción RT consistió en calentar a 42°C durante 60 minutos; calentar a 95°C durante 2 minutos, y enfriar a 4°C durante 1 minuto.

2. Amplificación

- 10 Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los productos cDNA resultantes de la reacción de transcripción inversa, utilizando el protocolo experimental descrito a continuación. En la reacción de amplificación se utilizaron dNTPs naturales.

PCR en tiempo real:

<i>Mezcla de reacción:</i>	<i>Cantidad:</i>	<i>Para 15 reacciones:</i>
Tampón PCR 10x	2,5 µl	37,5 µl
Mezcla de dNTPs 10x (natural)	2,5 µl	37,5 µl
Cebador Directo (2 µM)	2,5 µl	37,5 µl
Cebador Inverso (2 µM)	2,5 µl	37,5 µl
SYBR Verde 2X	2,5 µl	37,5 µl
Mezcla de reacción RT	2,5 µl	37,5 µl
Polimerasa JumpStart (1 U/µl)	1 µl	15 µl
Agua	9 µl	135 µl
Volumen total:	25 µl	375 µl
(El Tampón 10x comprendía: KCl 500 mM, MgCl ₂ 20 mM, Tris HCl 200 mM (pH 8,0))		

El perfil de temperatura utilizado en la reacción PCR fue: (95°C 2' → 95°C 10" → 56°C 45")₅₅.

- 15 Se diseñaron cebadores de modo que fueran específicos para la secuencia diana de miRNA a la que se hace referencia como miR-155, como se muestra en la Figura 1. El cebador inverso se diseñó para uso en la reacción de transcripción inversa (RT) a fin de producir un molde de cDNA complementario a miR-155. El cebador inverso se solapaba con la secuencia miR-155 a lo largo de 8 bases, formando un dúplex que tenía un valor T_m predicho de > 45°C.

- 20 Sin embargo, como puede verse en la Figura 1, el cebador PCR directo se superpone con el cDNA a lo largo de 12 bases. Dado el pequeño tamaño del miR-155 diana, el diseño de este cebador para tener mayor superposición con la secuencia diana podría conducir a una superposición con el cebador inverso, promoviendo así la formación de cebador-dímero durante la PCR subsiguiente. Aunque la secuencia del cebador en este ejemplo contenía cuatro bases d(2-amA)TP modificadas en la región de superposición con la secuencia diana de miR-155, se predice que el cebador formará un dúplex de superposición con cDNA a T_m = ~ 40°C. Las temperaturas típicas de reasociación
25 utilizadas en las reacciones PCR están comprendidas en el intervalo de ~ 60-65°C. En los experimentos descritos,

se utilizó una temperatura de reasociación de 56°C. Así pues, podría esperarse que esta laguna de 16°C entre la temperatura de reasociación de la PCR y la estabilidad de dúplex del cebador directo hibridado a cDNA condujera a una reducción del rendimiento de la PCR cuando el cDNA producido por transcripción inversa participa subsiguientemente en una reacción PCR.

- 5 Sin embargo, se encontró que el uso de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex durante la reacción de transcripción inversa mejoraba el rendimiento de la síntesis de cDNA así como la amplificación subsiguiente por PCR. La mezcla de dNTP estabilizadora de dúplex utilizada durante la transcripción inversa contenía d(2-amA)TP, d(5-PrU)TP, d(5-PrC)TP y dGTP. La amplificación subsiguiente por PCR se realizó en presencia de dNTPs naturales. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 2, que demuestra
- 10 que la incorporación de dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex durante la transcripción inversa de miR-155 mejoraba sustancialmente la eficiencia y sensibilidad subsiguientes en la detección basada en amplificación de esta secuencia diana de RNA corta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para transcripción inversa de una secuencia diana de RNA pequeña de longitud inferior a aproximadamente 100 nucleótidos, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende la secuencia diana de RNA pequeña con:

5 (i) un cebador que es suficientemente complementario a la secuencia diana de RNA pequeña para hibridarse a ella, y

(ii) una DNA-polimerasa dependiente de RNA que tiene actividad de transcriptasa inversa; y

(b) sintetizar cDNA complementario a la secuencia diana de RNA pequeña en presencia de una mezcla de dNTPs que comprende al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex que es un sustrato para la DNA-polimerasa dependiente de RNA.

10

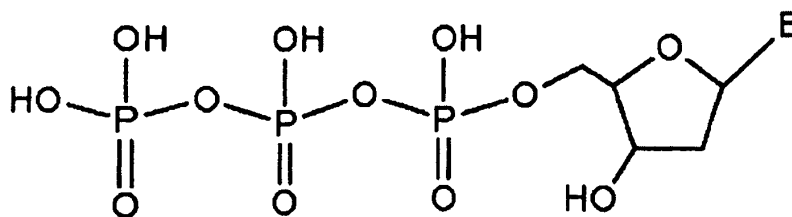
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además el paso de realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico que utiliza cebadores de amplificación que son suficientemente complementarios a la secuencia diana de RNA pequeña y su complemento para hibridarse a ella y dar lugar a productos de amplificación en presencia de DNA-polimerasa.

15

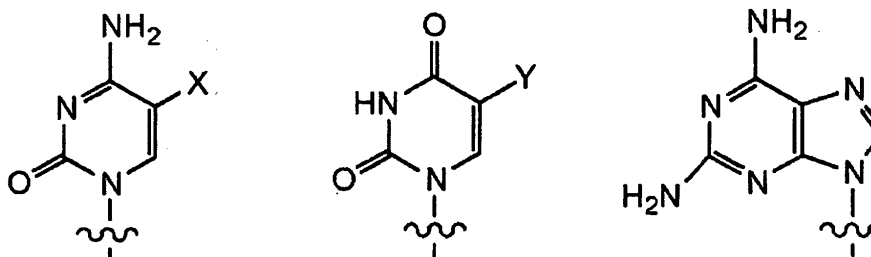
3. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de dNTPs comprende

(a) un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex que es una pirimidina sustituida en la posición 5;

(b) un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex que tiene la fórmula:

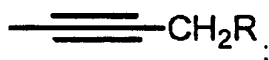


donde B se selecciona de:

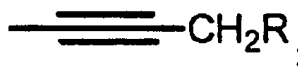


20

X se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃ o



25 Y se selecciona de -F, -Cl, -Br, -I o



R es -H, -OH, -OCH₃ o -NH₂; y/o

(c) un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex seleccionado de d(2-amA)TP, d(5-PrU)TP y/o d(5-PrC)TP.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de dNTPs comprende al menos dos de d(2-amA)TP, d(5-PrU)TP y d(5-PrC)TP y/o dGTP.

5 5. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia diana de RNA pequeña tiene aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia diana de RNA pequeña es una secuencia de miRNA.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el cebador tiene incorporado en él uno o más dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex.

10 8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente los pasos de:

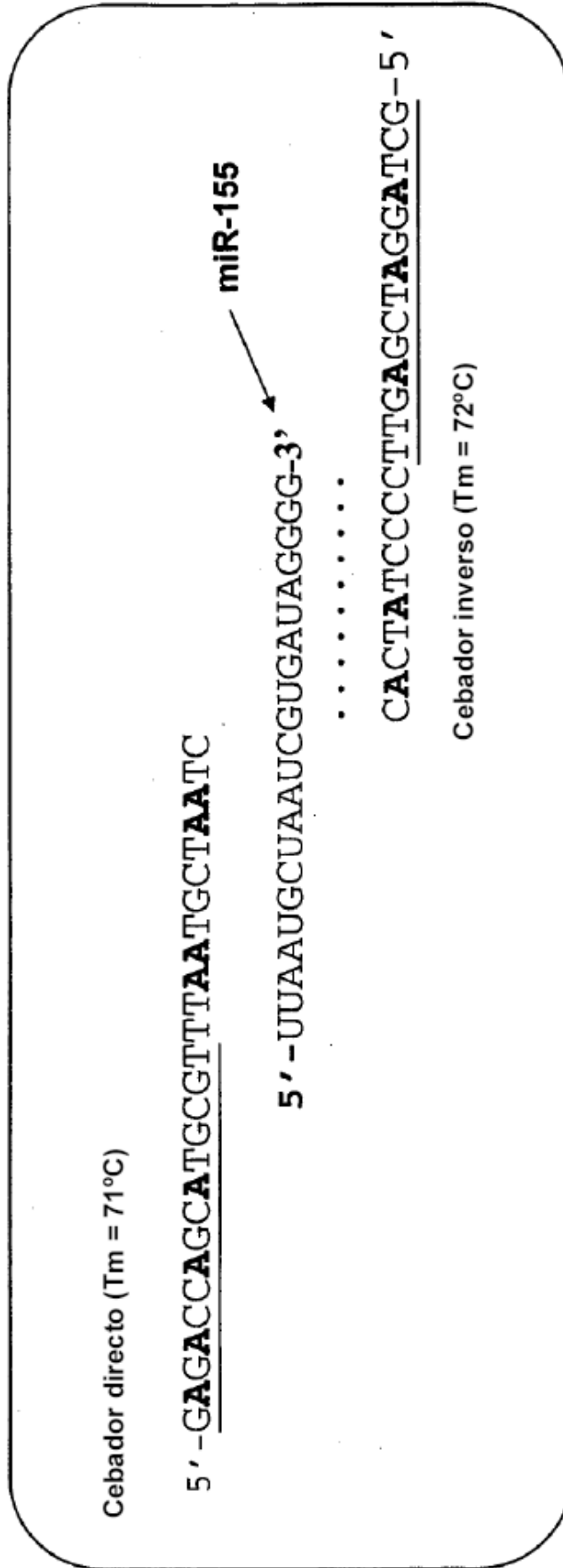
(a) tratar el cDNA formado en el paso (b) para proporcionar cDNA monocatenario;

(b) poner en contacto el cDNA monocatenario con un segundo cebador que es suficientemente complementario al cDNA para hibridarse al mismo e iniciar la síntesis de un producto de extensión en presencia de una DNA-polimerasa para producir una molécula de cDNA bicatenario.

15 9. El método de la reivindicación 2, en donde la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción en cadena de polimerasa.

10. El método de la reivindicación 2, en donde uno o más de los cebadores de amplificación comprende dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex incorporados en él.

20 11. El método de la reivindicación 2, en donde la reacción de amplificación se realiza en presencia de una mezcla de desoxinucleósido-5'-trifosfatos que contiene al menos un dNTP modificado en la base y estabilizador de dúplex.



A es 2,6-diaminopurina

Se han subrayado las secuencias de cola artificiales de los cebadores

Figura 1 – Diseño de cebadores PCR para detección de miR-155

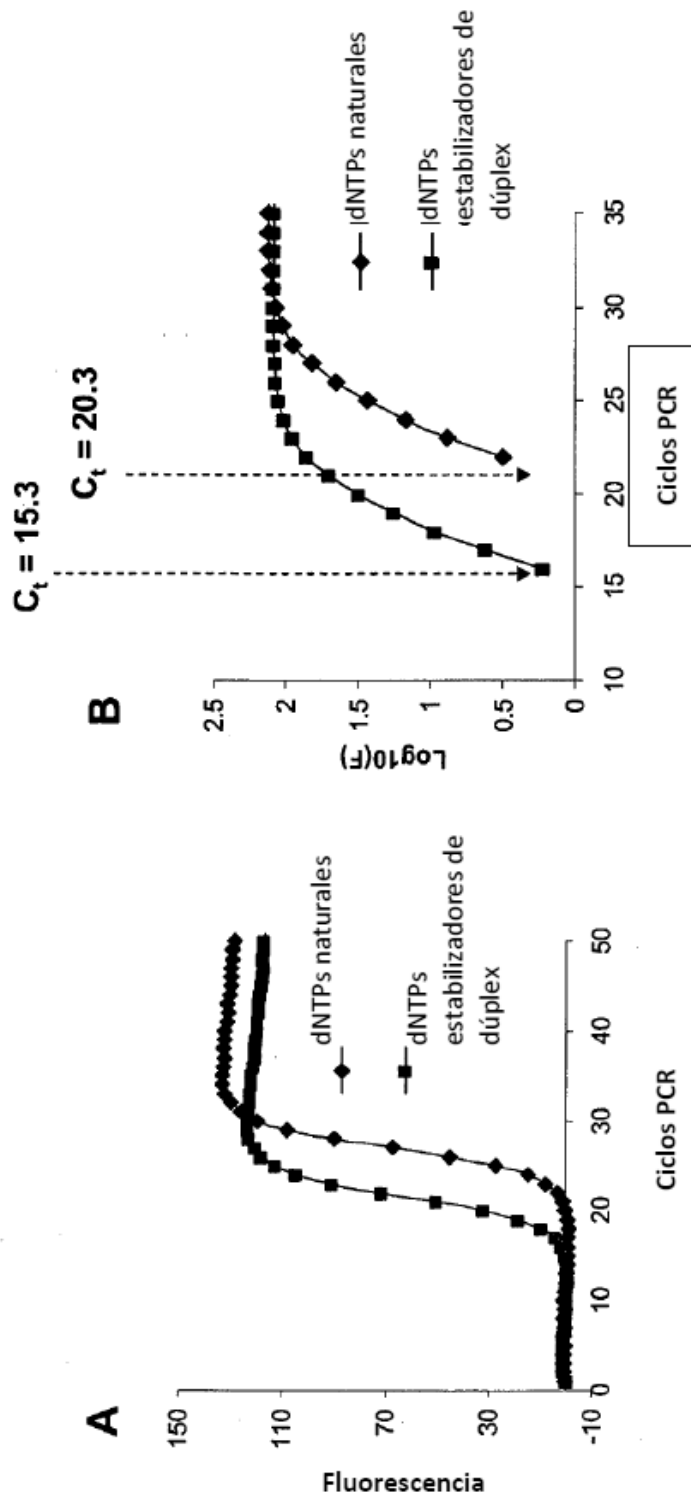


Figura 2 – Mejora en eficiencia y sensibilidad PCR de la detección de miRNA utilizando dNTPs modificados en la base y estabilizadores de dúplex durante la reacción de Transcripción Inversa (síntesis de cDNA)