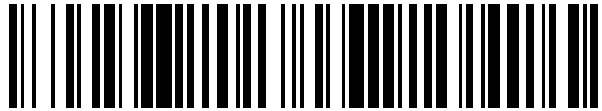


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 378**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12812526 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2794916**

54 Título: **Métodos y reactivos para reducir la amplificación no específica**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579317 P

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

28.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BODEPUDI, VEERAI AH;
SCHOENBRUNNER, NANCY J. y
WILL, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 575 378 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 y reactivos para reducir la amplificación no específica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y de la química de los ácidos nucleicos. Más concretamente, se refiere a métodos y reactivos para mejorar la fiabilidad de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.

10

Antecedentes de la invención

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) hizo posible la amplificación in vitro de las secuencias de ácidos nucleicos. La PCR se describe en las patentes US nº 4.683.195, nº 4.683.202 y nº 4.965.188; Saiki et al., *Science* 230:1350-1354, 1985; Mullis et al., *Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986, y Mullis and Faloona, *Methods Enzymol.* 155:335-350, 1987. El desarrollo y la aplicación de la PCR se describen ampliamente en la literatura. Por ejemplo, se comenta un abanico de temas relacionados con la PCR en *PCR Technology -principles and applications for DNA amplification*, 1989, (ed. H.A.Erlich) Stockton Press, New York; *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, 1990, (ed. M.A. Innis et al.) Academic Press, San Diego; and *PCR Strategies*, 1995 (ed. M.A. Innis et al.) Academic Press, San Diego. Los proveedores comerciales, tales como Applied Biosystems (Foster City, CA), comercializan reactivos de PCR y han publicado protocolos de PCR.

Desde la publicación original de la amplificación de ácidos nucleicos, se han descrito diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos basados en cebadores, entre ellos, aunque sin limitación, el ensayo de desplazamiento de cadena (Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396, 1992; Walker et al., *Nucleic Acids Res.* 20:1691-1696, 1992, y la patente US nº 5.455.166) y los sistemas de amplificación basados en la transcripción, incluyendo los métodos descritos en las patentes US nº 5.437.990, nº 5.409.818 y nº 5.399.491, el sistema de amplificación basado en la transcripción (SAT) (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989) y la replicación autosostenida de secuencias (3SR) (Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990, y el documento nº WO 92/08800). Se proporciona una revisión de los sistemas de amplificación en Abramson y Myers, *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47, 1993.

La especificidad de las reacciones de amplificación basadas en cebadores depende en gran medida de la especificidad de la hibridación y extensión de los cebadores. Bajo las temperaturas elevadas utilizadas en una amplificación típica, los cebadores se hibridan únicamente con la secuencia diana deseada. Sin embargo, las mezclas de reacción de amplificación típicamente se ensamblan a temperatura ambiente, a una temperatura muy inferior a la necesaria para garantizar la especificidad de la hibridación del cebador. Bajo estas condiciones menos restrictivas, los cebadores pueden unirse no específicamente a otras secuencias de ácidos nucleicos complementarias sólo parcialmente, o a otros cebadores e iniciar la síntesis de productos de extensión no deseados, los cuales pueden resultar amplificados conjuntamente con la secuencia diana. La amplificación de productos de extensión de cebador no específicos puede competir con la amplificación de las secuencias diana y puede reducir significativamente la eficiencia de la amplificación de la secuencia deseada.

Un tipo observado frecuentemente de producto de amplificación no específico es un artefacto independiente del molde de reacciones de amplificación denominadas "dímero de cebadores". El dímero de cebadores es un fragmento de doble cadena la longitud del cual típicamente es similar a la suma de las longitudes de los dos cebadores y aparentemente se produce en el caso de que se extienda un cebador sobre el otro cebador. El producto de extensión resultante forma un molde no deseado que, debido a su corta longitud, se amplifica eficientemente.

La amplificación no específica puede reducirse mediante la reducción de la formación de productos de extensión de cebador antes del inicio de la reacción. En un método, denominado protocolo de "inicio en caliente", se omiten de la mezcla de reacción uno o más reactivos críticos hasta que la temperatura se ha elevado suficientemente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria. Los métodos de inicio en caliente manuales, en los que los tubos de reacción se abren después de la etapa de incubación a alta temperatura y se han añadido los reactivos faltantes, resultan laboriosos e incrementan el riesgo de contaminación de la mezcla de reacción. Alternativamente puede utilizarse un material sensible al calor, tal como cera, para separar o secuestrar componentes de la reacción, tal como se indica en la patente US nº 5.411.876 y en Chou et al., *Nucl. Acids Res.* 20(7):1717-1723, 1992. En estos métodos, una incubación pre-reacción a temperatura elevada funde el material sensible al calor, permitiendo de esta manera que se mezclen los reactivos.

Otro método para reducir la formación de productos de extensión de cebador antes del inicio de la reacción se basa en la inactivación reversible por calor de la ADN polimerasa. Las patentes US nº 5.773.258 y nº 5.677.152 describen ADN polimerasas modificadas reversiblemente mediante la unión covalente de un grupo modificador. La incubación de la ADN polimerasa inactivada a temperatura elevada resulta en el corte del enlace modificador-enzima, reactivando de esta manera el enzima.

La inhibición reversible no covalente de una ADN polimerasa por anticuerpos específicos de la ADN polimerasa se describe en la patente US nº 5.338.671.

5 La amplificación no específica también puede reducirse mediante degradación enzimática de los productos de extensión formados antes del inicio de la reacción, utilizando los métodos descritos en la patente US

10 nº 5.418.149. La degradación de los productos de extensión recién sintetizados se consigue incorporando en la mezcla de reacción dUTP y UNG, e incubando la mezcla de reacción a una temperatura de entre 45°C y 60°C antes de llevar a cabo la reacción de amplificación. La extensión del cebador resulta en la formación de ADN que contiene uracilo, que es degradada por la UNG bajo las condiciones pre-amplificación. Una desventaja de dicho método es que la degradación del producto de extensión compite con la formación de producto de extensión y la eliminación del producto de extensión de cebador no específico puede ser menos completa. Una ventaja de dicho método es que el ADN que contiene uracilo que se ha introducido en la mezcla de reacción como contaminación de una reacción anterior también resulta degradado y, de esta manera, el método reduce también el problema de la contaminación de una PCR por el ácido nucleico amplificado de reacciones anteriores.

20 Otro método para reducir la formación de productos de extensión de cebador antes del inicio de la reacción se basa en la utilización de cebadores modificados en el extremo 3' o en una posición próxima al mismo mediante la adición de una fracción a una amina exocíclica, tal como se indica en la patente US nº 6.001.611.

25 Otro método de prevención de la amplificación no específica se basa en la utilización de nucleótidos modificados químicamente de manera reversible en los cebadores o en el molde, tal como se indica en el documento nº WO 01/75139. Las modificaciones pueden encontrarse en la posición N² de la guanosina y la modificación puede ser un grupo glioxal.

30 Las técnicas convencionales de biología molecular y química de los ácidos nucleicos, las cuales se encuentran comprendidas en los conocimientos del experto en la materia, se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning -A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins. eds., 1984); PCR Technology -principles and applications for DNA amplification, 1989, (ed. H.A. Erlich) Stockton Press, New York; PCR Protocols: A guide to methods and applications, 1990, (ed. M.A. Innis et al.) Academic Press, San Diego; and PCR Strategies, 1995 (ed. M.A. Innis et al.) Academic Press, San Diego.

35 El documento nº WO 01/75139 da a conocer un método para prevenir la amplificación no específica utilizando nucleótidos modificados químicamente de manera reversible en los cebadores o en el molde. Entre las modificaciones se incluyen un grupo glioxal en la posición N² de la guanosina.

Descripción resumida de la invención

40 La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que en determinadas reacciones de amplificación, en particular en reacciones que contienen múltiples cebadores y sondas para la amplificación y detección de múltiples ácidos nucleicos diana (por ejemplo reacción de PCR multiplex), la sonda o sondas pueden servir como molde que podría conducir a la amplificación no específica que, a su vez, proporcionaría la señal de falsos positivos. Para reducir la amplificación no específica basada en las sondas en la PCR, pueden utilizarse modificadores del surco menor que interfieren con la actividad de la ADN polimerasa pero que permiten el apareamiento de bases con un nucleótido complementario. Un ejemplo de lo anterior, de un modificador de surco menor, es el análogo de la desoxiguanosina, N²-bencil-guanosina (N²-bencil-dG), que es el objeto de la presente invención tal como se describe en la presente memoria.

50 De esta manera, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para prevenir la extensión por una ADN polimerasa termoestable de un oligonucleótido cebador que se hibrida con una secuencia de nucleótidos molde en un ensayo que utiliza la extensión de un cebador de una manera dependiente del molde, en el que el ensayo se selecciona de entre el grupo que consiste de amplificación por PCR, secuenciación del ADN y genotipado, que comprende incorporar un nucleótido N²-bencil-desoxiguanosina (N²-bencil-dG) en la secuencia de nucleótidos molde, en el que el oligonucleótido cebador no puede ser extendido en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del nucleótido N²-bencil-desoxiguanosina.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para reducir o prevenir la amplificación no específica de ácidos nucleicos durante una reacción de amplificación que comprende proporcionar por lo menos una pareja de oligonucleótidos cebadores capaz de amplificar una secuencia diana de ácidos nucleicos, proporcionar una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG que bloquea la extensión del oligonucleótido cebador por una ADN polimerasa en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del nucleótido N²-bencil-dG, al hibridarse el cebador oligonucleótido con la sonda oligonucleótida. En una realización, el ligante del surco menor es un nucleósido modificado.

65

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una mezcla de reacción para la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende por lo menos una pareja de cebadores oligonucleótidos y por lo menos una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG.

5 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende por lo menos una pareja de cebadores oligonucleótidos, por lo menos una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG, por lo menos un biocatalizador que incorpora nucleótidos, nucleósidos trifosfato, un tampón adecuado para la amplificación de ácidos nucleicos por como mínimo un biocatalizador que incorpora nucleótidos, y un juego de instrucciones para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra (A) la estructura de la N²-bencil-desoxiguanosina (N²-bencil-dg) y (B) el apareamiento de bases entre la N²-bencil-desoxiguanosina (N²-bencil-dg) y la desoxicitosina (dc).

15 La figura 2 es una representación gráfica del bloqueo de la extensión del cebador utilizando un ácido nucleico molde que contiene N²-bencil-dg: (A) muestra un molde sin modificación, (B) y (C) muestra moldes con modificaciones, en los que X es N²-bencil-dg.

20 La figura 3 muestra los resultados de la reacción de extensión de cebador del Ejemplo 1 en los puntos temporales de 0 min. (A) y 5 min. (B).

La figura 4 muestra las temperaturas de fusión de un oligonucleótido complemento contra tres oligonucleótidos de ensayo, un oligonucleótido de control no modificado y dos oligonucleótidos con la secuencia idéntica como oligonucleótido de control con la modificación de N²-bencil-dg en la posición N-4 o N-9.

25 La figura 5 muestra la eficiencia de corte de un residuo de N²-bencil-dg que contenía sondas taqman[®] en comparación con la sonda taqman[®] de control con una secuencia idéntica.

30 Descripción detallada de la invención

Definiciones

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

40 La expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y comprende ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos péptido-nucleicos (APN), conjugados APN-ADN, conjugados APN-ARN, etc., que comprenden nucleótidos unidos entre sí covalentemente, de manera lineal o ramificada. Un ácido nucleico es típicamente de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al., Tetrahedron 49(10):1925, 1993), fosforotioato (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19:1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosforoamidita (ver Eckstein, Oligonucleotides and Analogue: A Practical Approach, Oxford University Press, 1992), y esqueletos y enlaces de ácidos péptido-nucleicos (ver Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895, 1992). Entre otros análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos con esqueletos cargados positivamente (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097), esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863) y esqueletos no de ribosa, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins et al., Chem. Soc. Rev., páginas 169 a 176, 1995) y también se describen análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. y E. News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden llevarse a cabo para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcajes, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en medios fisiológicos.

60 Además de dichas bases heterocíclicas naturales que se observan típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), entre los análogos de nucleótidos también se incluyen las bases heterocíclicas no naturales, tales como las indicadas en, por ejemplo Seela et al., Helv. Chim. Acta 82:1640, 1999. Determinadas bases utilizadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_f). Por ejemplo, algunos de ellos incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares; ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y

xantina, derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina, 6-azacitidina, 5-fluorocitidina, 5-clorocitidina, 5-yodocitidina, 5-bromocitidina, 5-metilcitidina, 5-propinilcitidina, 5-bromoviniluracilo, 5-fluorouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-metoximetiluracilo, 5-etiniluracilo, 5-propiniluracilo y similares.

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

15 Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster de fosfato de un nucleósido, que presenta uno, dos, tres o más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de una fracción sacárida del nucleósido.

20 Un "nucleótido purina" se refiere a un nucleósido que comprende una base purina, mientras que un "nucleótido pirimidina" se refiere a un nucleótido que comprende una base pirimidina.

25 Un "nucleótido modificado" se refiere a bases de ácidos nucleicos raras o menores, nucleótidos y modificaciones, derivaciones o análogos de bases convencionales o nucleótidos e incluye nucleótidos sintéticos que presentan fracciones bases modificadas y/o fracciones sacáridas modificadas (ver *Protocols for Oligonucleotide Conjugates, Methods in Molecular Biology*, Vol. 26 (Suhier Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, N.J., (1994)), y *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach* (Fritz Eckstein, Ed., IRL Press, Oxford University Press, Oxford).

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

40 Un "apareamiento de bases de Watson-Crick" o simplemente "apareamiento de bases" se refiere a los enlaces de hidrógeno "convencionales" dentro de una molécula de ácidos nucleicos de doble cadena. El apareamiento de bases de Watson-Crick son enlaces de hidrógeno entre adenina y timina, entre guanina y citosina, entre adenina y uracilo y entre análogos de dichas bases.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hibridación" y similares se utiliza intercambiamente y se refiere a la interacción de apareamiento de bases de un polinucleótido con otro polinucleótido (típicamente un polinucleótido antiparalelo) que resulta en la formación de un dúplex u otra estructura de orden más alto, típicamente denominado complejo de hibridación. La interacción primaria entre las moléculas polinucleótidas antiparalelas típicamente es específica de base, por ejemplo A/T y G/C, mediante enlaces de hidrógeno de Watson/Crick y/o de tipo Hoogsteen. No es un requisito que dos polinucleótidos presenten una complementariedad de 100% a lo largo de su longitud completa para conseguir la hibridación. En algunos aspectos, puede formarse un complejo de hibridación a partir de interacciones intermoleculares, o alternativamente, puede formarse a partir de interacciones intramoleculares.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "amplificación" y "amplificando" y similares se refieren de manera general a cualquier procedimiento que resulte en un incremento del número de copias de una molécula o juego de moléculas relacionadas. Tal como se aplica a las moléculas polinucleótidas, la amplificación se refiere a la producción de múltiples copias de una molécula polinucleótida, o una parte de una molécula polinucleótida, típicamente partiendo de una cantidad reducida de un polinucleótido (por ejemplo un genoma vírico), en el que el material amplificado (por ejemplo un amplicón de PCR vírico) típicamente es detectable. La amplificación de polinucleótidos comprende una diversidad de procedimientos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas cuantas copias de una molécula de ADN molde durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción de amplificación por desplazamiento de cadena (ADC), una reacción de amplificación mediada por transcripción (AMT) , una reacción de amplificación basada en una secuencia de ácidos nucleicos (ABSAN) o una reacción en cadena de la ligasa (RCL) son formas de amplificación. La amplificación no se encuentra limitada a la duplicación estricta de la molécula de partida. Por ejemplo, la generación

de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN vírico en una muestra utilizando RT-PCR es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una única molécula de ADN durante el procedimiento de transcripción también es una forma de amplificación.

- 5 En algunas realizaciones, tras la amplificación opcionalmente se llevan a cabo etapas adicionales, por ejemplo, aunque sin limitación, el marcaje, la secuenciación, la purificación, el aislamiento, la hibridación, la resolución de tamaños, la expresión, la detección y/o la clonación.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) se refiere a un método para la amplificación bien conocido de la técnica para incrementar la concentración de un segmento de un polinucleótido diana en una muestra, en el que la muestra puede ser una única especie polinucleótida o múltiples polinucleótidos. Generalmente, el procedimiento de PCR consiste en la introducción de un exceso molar de dos o más cebadores oligonucleótidos extensibles a una mezcla de reacción que comprende la secuencia o secuencias diana deseadas, en la que los cebadores son complementarios respecto a cadenas opuestas de la secuencia diana de doble cadena. La mezcla de reacción se somete a un programa de ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa, resultando en la amplificación de la secuencia diana deseada flanqueada por los cebadores de ADN. La PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una reacción de PCR que utiliza un molde de ARN y una transcriptasa inversa, o un enzima que presenta actividad de transcriptasa inversa, para generar en primer lugar una molécula de ADN de cadena sencilla antes de los ciclos múltiples de alargamiento de cebador de ADN polimerasa dependiente de ADN. La PCR multiplex se refiere a reacciones de PCR que producen más de un producto amplificado en una única reacción, típicamente mediante la inclusión de más de dos cebadores en una única reacción. Los métodos para una amplia diversidad de aplicaciones de PCR son ampliamente conocidos de la técnica y se describen en muchas fuentes, por ejemplo Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, vol. 15, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1994.

25 Un "cebador de ácidos nucleicos" o "cebador" es un oligonucleótido que puede hibridarse con un ácido nucleico molde y que permite la extensión o alargamiento de la cadena utilizando un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Aunque se utilizan en ocasiones otras longitudes de cebador, típicamente los cebadores presentan longitudes de entre 15 y 35 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos de molde. Un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para hibridarse con el ácido nucleico molde para que pueda producirse la extensión. Sin embargo, el éxito de la extensión generalmente requiere una mayor complementariedad (es decir, menos no correspondencias respecto al molde) en el extremo 3' del cebador. Un ácido nucleico cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante técnicas radiológicas, espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas o químicas.

35 Un "cebador extendido" se refiere a un cebador al que se ha añadido uno o más nucleótidos adicionales. La "extensión de cebador" es la acción del enzima por la que se añaden nucleótidos adicionales al cebador.

40 Un "ácido nucleico molde", "molde" o "diana" se refiere a un ácido nucleico con el que puede hibridarse un ácido nucleico cebador y que puede extenderse bajo condiciones adecuadas. En el contexto de la amplificación de ácidos nucleicos, la "diana" preferentemente es una región de ácidos nucleicos de doble cadena, que consiste de las secuencias complementarias por lo menos parcialmente a por lo menos dos secuencias de cebador y la secuencia intermedia. Una diana también puede ser un ácido nucleico de cadena sencilla, que consista de una secuencia complementaria por lo menos parcialmente respecto a un cebador y una secuencia parcialmente idéntica al segundo cebador. Los ácidos nucleicos molde pueden existir en forma de fragmentos aislados de ácidos nucleicos o formar parte de un fragmento de ácido nucleico de mayor tamaño. Los ácidos nucleicos diana pueden derivarse o aislarse a partir de esencialmente cualquier fuente, tal como microorganismos en cultivo, microorganismos no en cultivo, mezclas biológicas complejas, tejidos, sueros, tejidos o muestras antiguas o conservadas, aislados ambientales o similares. Además, entre los ácidos nucleicos molde se incluyen opcionalmente, o se derivan a partir de, ADNc, ARN, ADN genómico, ADN genómico clonado, bibliotecas de ADN genómico, ADN o ARN fragmentado enzimáticamente, ADN o ARN químicamente fragmentado, ADN o ARN fragmentado físicamente, o similares. Los ácidos nucleicos molde también pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sonda" se refiere típicamente a un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana de interés. Típicamente, aunque no exclusivamente, una sonda está asociada a un marcaje o fracción informadora adecuada de manera que la sonda (y por lo tanto, su diana) puede ser detectada, visualizada, medida y/o cuantificada. Entre los sistemas de detección para sondas marcadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la detección de fluorescencia, la inhibición de fluorescencia (por ejemplo al utilizar un sistema de detección de parejas de FRET), la actividad enzimática, la absorbancia, la masa molecular, la radioactividad, la luminiscencia o las propiedades de unión que permiten la unión específica del informador (por ejemplo en el caso de que el informador sea un anticuerpo). En algunas realizaciones, una sonda puede ser un anticuerpo, y no un polinucleótido, que presenta especificidad de unión para una secuencia nucleótida de ácidos nucleicos de interés. No se pretende que la presente invención se encuentre limitada a cualquier sonda, marcaje o sistema de detección de sondas en particular. La fuente del polinucleótido utilizado en la sonda no se encuentra

limitada y puede producirse sintéticamente en un sistema no enzimático o puede ser un polinucleótido (o una parte de un polinucleótido) que se produce utilizando un sistema biológico (por ejemplo enzimático) (por ejemplo en una célula bacteriana).

5 Típicamente una sonda es suficientemente complementaria a una secuencia diana específica contenida en un ácido nucleico para formar un complejo de hibridación estable con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación seleccionadas, tales como, aunque sin limitación, condiciones de hibridación restrictiva. Un ensayo de hibridación que se lleve a cabo utilizando la sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas permite la detección selectiva de una secuencia diana específica.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un cebador es "específico" para una secuencia molde en el caso de que el número de no correspondencias presentes entre la secuencia del cebador y la secuencia diana es inferior al número de no correspondencias presente entre la secuencia del cebador y secuencias no diana que pueden encontrarse presentes en la muestra. Pueden seleccionarse condiciones de hibridación bajo las que se forman dúplex estables únicamente en el caso de que el número de no correspondencias presentes no sea superior al número de no correspondencias presentes entre la secuencia del cebador y la secuencia diana. Bajo dichas condiciones, el cebador puede formar un dúplex estable únicamente con una secuencia diana. De esta manera, la utilización de cebadores específicos de diana bajo condiciones de amplificación convenientemente restrictivas de dichas secuencias diana que contienen los sitios de unión del cebador a la diana. La utilización de condiciones de amplificación específicas de secuencia permite la amplificación específica de aquellas secuencias diana que contienen los sitios de unión a cebador exactamente complementarios.

15 La expresión "amplificación no específica" se refiere a la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diferentes de la secuencia diana, que resulta de la hibridación de los cebadores con secuencias diferentes de la secuencia diana y que después sirven como sustrato para la extensión de cebadores. La hibridación de un cebador con una secuencia no diana se denomina "hibridación no específica" y puede producirse durante las condiciones de temperatura más baja y de astringencia reducida previas a la amplificación.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "amplicón" se refiere a una molécula polinucleótida (o colectivamente, la pluralidad de moléculas) producidas tras la amplificación de un ácido nucleico diana particular. El método de amplificación utilizado para generar el amplicón puede ser cualquier método adecuado, más típicamente, por ejemplo, mediante la utilización de una metodología de PCR. Un amplicón es típicamente, aunque no exclusivamente, un amplicón de ADN. Un amplicón puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, o una mezcla de los mismos en cualquier proporción de concentraciones.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "detección en tiempo real de la acumulación de amplicones" se refiere a la detección y, típicamente, a la cuantificación de los mismos, de un amplicón o amplicones específicos, a medida que el amplicón o amplicones son producidos (típicamente mediante PCR) sin necesidad de una etapa de detección o cuantificación tras completarse la amplificación. Las expresiones "PCR en tiempo real" o "PCR cinética" se refieren a la detección y/o cuantificación en tiempo real de amplicones generados en una PCR.

30 Un método común para la detección en tiempo real de la acumulación de amplicones es mediante un ensayo de nucleasa 5', también denominado ensayo de nucleasa 5' fluorogénica, por ejemplo un análisis de TaqMan; ver Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, 1991, y Heid et al., Genome Research 6:986-994, 1996. En el procedimiento de PCR TaqMan, se utilizan dos cebadores oligonucleótidos para generar un amplicón específico de la reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido (la sonda TaqMan) para hibridarlo con una secuencia de nucleótidos en el amplicón situado entre los dos cebadores de PCR. La sonda puede presentar una estructura que no es extensible por la ADN polimerasa utilizada en la reacción de PCR y típicamente (aunque no necesariamente) se encuentra comarcada con un pigmento informador fluorescente y una fracción inhibidora en estrecha proximidad entre sí. La emisión del pigmento informador es inhibida por la fracción inhibidora en el caso de que el emisor fluorescente y el inhibidor se encuentran en estrecha proximidad, tal como se encuentran en la sonda. En algunos casos, la sonda puede marcarse con únicamente un pigmento informador fluorescente u otra fracción detectable.

35 La reacción de PCR TaqMan utiliza una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable que presenta una actividad de nucleasa 5' a 3'. Durante la reacción de amplificación por PCR, la actividad de nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa corta la sonda marcada que se encuentra hibridada con el amplicón de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian del complejo de cebador/molde, de manera que el pigmento informador se encuentra libre del efecto inhibidor de la fracción inhibidora. Se libera aproximadamente una molécula de pigmento informador por cada nueva molécula de amplicón sintetizada, y la detección del pigmento informado no inhibido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos, de manera que la cantidad de pigmento informador fluorescente liberado es directamente proporcional a la cantidad de amplicón molde.

40 Una medida de los datos de ensayo de TaqMan típicamente se expresa como ciclo umbral (CU). Se registraron los niveles de fluorescencia durante cada ciclo de PCR y son proporcionales a la cantidad de producto amplificado hasta este punto en la reacción de amplificación. El ciclo de PCR en el que se registra por primera vez la señal

fluorescente como estadísticamente significativa, o en que la señal fluorescente es superior a algún otro nivel arbitrario (por ejemplo el nivel arbitrario de fluorescencia, o NAF), es el ciclo umbral (CU).

5 Los protocolos y reactivos para los ensayos de nucleasas 5' son bien conocidos por el experto en la materia y se han descrito en diversas fuentes. Por ejemplo, las reacciones de nucleasa 5' y las sondas se indican en la patente US nº 6.214.979, titulada "Homogeneous assay system", publicada el 10 de abril de 2001, de Gelfand et al.; la patente US nº 5.804.375, titulada "Reaction mixtures for detection of target nucleic acids", publicada el 8 de septiembre de 1998, de Gelfand et al.; patente US nº 5.487.972, titulada "Nucleic acid detection by the 5'-3' exonucleasa activity of polymerases acting on adjacently hybridized oligonucleotides", publicada el 30 de enero de 1996, de Gelfand et al., y la patente US nº 5.210.015, titulada "Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase", publicada el 11 de mayo de 1993, de Gelfand et al.

15 También se conocen variaciones de las metodologías de detección de amplicones en tiempo real y en particular en las que la sonda nucleasa 5' se sustituye por pigmento intercalante de ADN de doble cadena, resultando en fluorescencia que depende de la cantidad de amplicón de doble cadena que se encuentra presente en la reacción de amplificación; ver, por ejemplo, la patente US nº 6.171.785, titulada "Methods and devices for homogeneous nucleic acid amplification and detector", publicada el 9 de enero de 2001, de Higuchi, y la patente US nº 5.994.056, titulada "Homogeneous methods for nucleic acid amplification and detection", publicada el 30 de noviembre de 1999, de Higuchi.

20 Puede llevarse a cabo la PCR TaqMan® utilizando kits y equipos disponibles comercialmente, tales como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) o LightCycler® (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). En una realización preferente, el procedimiento de ensayo de nucleasa 5' se lleva a cabo en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real, tal como el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700. El sistema consiste de un termociclador, láser, dispositivo de carga acoplada (DCC), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, se recoge en tiempo real la señal fluorescente inducida por láser a través de cables de fibra óptica para la totalidad de los 96 pocillos y se detecta en la cámara de DCC. El sistema incluye software para operar el aparato y para analizar los datos.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "gen" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado a una función biológica. De esta manera, entre los genes se incluyen secuencias codificantes y, opcionalmente, las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de las secuencias codificantes.

35 Los ácidos nucleicos se "extienden" o "alargan" al incorporar nucleótidos adicionales en los ácidos nucleicos, por ejemplo por un biocatalizador incorporador de nucleótidos, en el extremo 3' de un ácido nucleico.

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

45 Un "grupo bencilo" se refiere a un grupo aromático monovalente con la fórmula $C_6H_5CH_2-$ y se utiliza intercambiamente con el término "fenilmetilo".

50 Un "genotipo" se refiere a la totalidad o parte de la constitución genética de una célula o sujeto, o grupo de células o sujetos. Por ejemplo, un genotipo incluye las mutaciones y/o alelos particulares (por ejemplo polimorfismos tales como los polimorfismos de nucleótido único (PNU) o similares) presentes en un locus dado o distribuidos en un genoma. El "genotipado" se refiere a un ensayo que determina el genotipo de una célula o sujeto.

55 Un "biocatalizador que incorpora nucleótidos" o "enzima incorporador de nucleótidos" se refiere a un catalizador (o enzima) que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Entre los enzimas incorporadores de nucleótidos ejemplares se incluyen ADN polimerasas, ARN polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y similares.

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

y similares.

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

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

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

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

Un "inicio en caliente" en el contexto de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos se refiere a un protocolo en el que se omite de la mezcla de reacción por lo menos un reactivo crítico (o, en caso de hallarse presente en la mezcla de reacción, el reactivo se mantiene inactivo) hasta que la temperatura se eleva suficientemente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria del cebador o cebadores. Un "enzima de inicio en caliente" es un enzima, típicamente una polimerasa de ácidos nucleicos, capaz de actuar como el reactivo "omitido" o inactivo en un protocolo de inicio en caliente.

La expresión "mezcla de reacción" se refiere a una solución que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción dada. Una "mezcla de reacción de amplificación", referida a una solución que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, típicamente contiene cebadores oligonucleótidos y una ADN polimerasa o ligasa en un tampón adecuado. Una "mezcla de reacción de PCR" típicamente contiene cebadores oligonucleótidos, los dNTP de una ADN polimerasa termoestable y un catión metálico divalente en un tampón adecuado. Una mezcla reacción se denomina completa en el caso de que contenga todos los reactivos necesarios para permitir la reacción e incompleta en el caso de que contenga sólo un subgrupo de los reactivos necesarios. El experto en la materia entenderá que los componentes de la reacción se almacenan rutinariamente en forma de soluciones separadas, conteniendo cada una un subgrupo de los componentes totales, por motivos de comodidad, almacenamiento o estabilidad, o para permitir el ajuste dependiente de la aplicación de las concentraciones de los componentes y que los componentes de la reacción se agrupan antes de la reacción para crear una mezcla de reacción completa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "kit" se utiliza en referencia a una combinación de artículos que facilita un procedimiento, método, ensayo análisis o manipulación de una muestra. Los kits pueden contener instrucciones escritas que describen cómo utilizar el kit (por ejemplo instrucciones que describen los métodos de la presente invención), reactivos químicos o enzimas requeridos para el método, cebadores y sondas, así como cualesquiera otros componentes.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que determinados nucleótidos modificados, en caso de hallarse presentes en un ácido nucleico molde, son capaces de impedir o inhibir la extensión de un cebador oligonucleótido por la ADN polimerasa, aunque todavía pueden mantener el apareamiento de bases de Watson-Crick con su base complementaria en el cebador. Uno de estos nucleótidos modificados es el análogo de la desoxiguanosina denominado N²-bencil-desoxiguanosina (N²-bencil-dG) que, tal como se muestra en la figura 1A,

contiene un grupo bencilo en el nitrógeno de C-2 del grupo amino exocíclico. Los nucleótidos con modificaciones covalentes de los grupos amino exocíclicos se indican en la patente US nº 6.001.611. La síntesis de dichos nucleótidos y los oligonucleótidos que incorporan dichos nucleótidos también se indican en la patente US nº 6.001.611.

5 Aunque sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que N²-bencil-dG es capaz de impedir la extensión de los cebadores al ocupar el surco menor del ADN de doble cadena, comportándose de esta manera como un "ligante de surco menor" e interfiriendo con el sitio activo de la ADN polimerasa. Sin embargo, el apareamiento de bases con un nucleótido desoxicitosina (dG) complementario todavía puede producirse ya que los tres enlaces de hidrógeno no resultan afectados por la presencia de la fracción bencilo (figura 1B).

10 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para impedir la extensión de una ADN polimerasa termoestable de un cebador oligonucleótido que se hibrida con una secuencia de nucleótidos molde, que comprende incorporar un ligante de surco menor en la secuencia de nucleótidos molde, en la que el ligante de surco menor es un nucleótido modificado y el nucleótido modificado es N²-bencil-dG y en el que el cebador no puede ser extendido en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del nucleótido N²-bencil-dG. Dicho método sería aplicable al rendimiento de la amplificación por PCR, a la secuenciación de ácidos nucleicos, al genotipado y a otras aplicaciones que utilizan la extensión de un cebador de una manera dependiente del molde.

15 Las propiedades únicas de N²-bencil-dG también permitirían su utilización en la reducción o bloqueo de la amplificación no específica en una reacción de amplificación basada en cebadores. Se cree que se produce la amplificación no específica en el caso de que se forme un dúplex de hibridación transitorio inestable entre un cebador y una molécula no diana, en el que el extremo 3' del cebador se aparea momentáneamente con una base complementaria en la otra molécula. La extensión inicial del cebador resulta en la formación de una secuencia complementaria que estabiliza el dúplex y permite la extensión posterior. La patente US nº 6.001.611 da a conocer la utilización de cebadores que contienen nucleótidos modificados para el bloqueo de la amplificación no específica que resulta de la formación de dímeros de cebadores en los que el dúplex de hibridación transitorio se forma entre un cebador y otro cebador. La N²-bencil-dG no se utilizaría en un cebador para bloquear la amplificación no específica porque su presencia en los productos de extensión de cebador que se utilizan como moldes en ciclos de amplificación posteriores causaría la terminación de la extensión del cebador. Sin embargo, en las reacciones de amplificación que utilizan una sonda (por ejemplo una sonda nucleasa 5' en el ensayo de PCR Taqman), la incorporación de N²-bencil-dG ha resultado en la reducción o el bloqueo de la amplificación no específica que resulta de que tiene lugar la hibridación entre un cebador y una sonda.

20 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir o impedir la amplificación no específica de ácidos nucleicos durante una reacción de amplificación que comprende proporcionar por lo menos una pareja de oligonucleótidos cebadores capaz de amplificar una secuencia diana de ácidos nucleicos, proporcionar una sonda oligonucleótida que incorpora un ligante de surco menor que bloquea la extensión del cebador por parte de una ADN polimerasa en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del ligante de surco menor al hibridarse con la sonda oligonucleótida, en el que el ligante de surco menor es un nucleótido modificado y el nucleótido modificado es N²-bencil-dG.

25 En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción para la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende por lo menos una pareja de cebadores oligonucleótidos y por lo menos una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además los reactivos y soluciones generalmente necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos, incluyendo un biocatalizador incorporador de nucleótidos, precursores de ácidos nucleicos, es decir, nucleósidos trifosfato, e iones orgánicos e inorgánicos, adecuados para el soporte de la actividad del biocatalizador incorporador de nucleótidos.

30 En otro aspecto, la invención proporciona kits para llevar a cabo la reacción de amplificación según la invención. El kit incluye generalmente componentes específicos de ensayo, así como componentes generalmente necesarios para llevar a cabo ensayos de amplificación del ADN. Como componentes específicos de ensayo, el kit de amplificación de la presente invención típicamente incluye por lo menos una pareja de oligonucleótidos cebadores, por lo menos un oligonucleótido sonda que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG y un juego de instrucciones para llevar a cabo la reacción de amplificación de la presente invención. En algunas realizaciones, el kit incluye dos o más parejas de oligonucleótidos cebadores y dos o más sondas oligonucleótidas, en el que cada sonda oligonucleótida incorpora un nucleótido N²-bencil-dG. Como componentes generalmente requeridos para la amplificación de los ácidos nucleicos, el kit de la presente invención típicamente incluye uno o más de entre un biocatalizador incorporador de nucleótidos, precursores de ácidos nucleicos, tales como nucleósidos trifosfato (desoxirribonucleósidos trifosfato o ribonucleósidos trifosfato), opcionalmente una pirofosfatasa, para minimizar la pirofosforólisis de los ácidos nucleicos, una uracil-N-glucosilasa (UNG) para la protección frente a la contaminación cruzada de las reacciones de amplificación, y reactivos y tampones previamente preparados necesarios para la reacción y detección de la amplificación.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: extensión de cebadores

5 Con el fin de demostrar que un ácido nucleico molde que contiene N²-bencil-dG es capaz de bloquear la extensión de un cebador por parte de la ADN polimerasa, tal como se ilustra gráficamente en la figura 2, se preparó un experimento de extensión de cebador utilizando un cebador oligonucleótido marcado con FAM y tres oligonucleótidos molde complementarios con las secuencias que se indican a continuación:

10 NJS01 FAM-CCCTCGCAGCCGTCACCAACTCA (SEC ID nº 1)
 NJS03 GGGAGCGTCGGCAGGTTGGTTGAGTAGGTCTTGTTT (SEC ID nº 2)
 NJS339-1A CGGAGCGTCGGCAGGTTGGTTGAGTAGETCTTGTTT (SEC ID nº 3)
 NJS339-2A CGGAGCGTCGGCAGGTTGGTTGAGTAGGTCTTETTT (SEC ID nº 4)
 (E = N²-bencil-dG)

15 Cada reacción de extensión de cebador (50 µl) contenía cebador 50 nM y oligonucleótido molde 75 nM, con 15 unidades (20 nM) de ADN polimerasa Z05D, 337,5 µM de cada uno de entre dATP, dCTP, dGTP y dUTP, tricina 50 mM (pH 8,0), acetato potásico 100 mM (pH 7,0), acetato de manganeso 3 mM, glicerol al 4%, DMSO al 5% y Tween-20 al 0,01%. La extensión del cebador con ADN polimerasa Z05D se llevó a cabo a 60°C y la reacción se terminó mediante la adición de EDTA en diversos puntos temporales. Los productos de extensión de cebador se diluyeron en tampón de carga con formamida y se analizaron mediante electroforesis capilar (analizador genético ABI PRISM® 3100) en presencia de estándares de tamaño marcados.

20 Se muestran los resultados en la figura 3. Los productos de extensión de los moldes que contenían N²-bencil-dG son claramente más pequeños que el producto de extensión del molde de control. Lo anterior indica que un ácido nucleico molde que contiene un residuo N²-bencil-dG puede detener o reducir drásticamente la tasa de extensión de un cebador por la ADN polimerasa.

Ejemplo 2: estabilidad de los dúplex

30 Para estudiar el efecto de la N²-bencil-dG sobre la hibridación, se llevó a cabo un experimento de temperatura de fusión utilizando un oligonucleótido complementario no modificado y tres oligonucleótidos de ensayo. Los tres oligonucleótidos de ensayo para los que se determinaron las temperaturas de fusión representan: (a) un oligonucleótido de control no modificado, (b) un oligonucleótido con una secuencia idéntica a (a) con N²-bencil-dG en la posición N-9 y (c) un oligonucleótido con una secuencia idéntica a (a) con N²-bencil-dG en la posición N-4. Las secuencias de nucleótidos de dichos oligonucleótidos son las siguientes:

35 Complemento 3' -AAACAAGACCTACTCAACCAACCTGCCGACGCTCCG (SEC ID nº 5)
 Control de ensayo 5' -TTTGTCTGGATGAGTTGGTTGGACGGCTGCGAGGC (SEC ID nº 6)
 40 Ensayo N-9 5' -TTTGTCTEGATGAGTTGGTTGGACGGCTGCGAGGC (SEC ID nº 7)
 Ensayo N-4 5' -TTTETTCTGGATGAGTTGGTTGGACGGCTGCGAGGC (SEC ID nº 8)

45 Las condiciones experimentales eran las siguientes: se preparó cada reacción en un volumen de 50 µl y en dos réplicas y contenía 40 pmoles de cada oligonucleótido de ensayo y 40 pmoles de oligonucleótido complementario, en un tampón que contenía acetato potásico 90 mM (pH 7,0), tricina 50 mM (pH 8,3), acetato manganeso 3 mM, glicerol al 3%, DMSO al 5%, y 300 µM de cada uno de entre dATP, dCTP y dGTP y 600 µM de dUTP. La temperatura de fusión para el dúplex de hibridación formado entre cada oligonucleótido de ensayo y el oligonucleótido complementario se determinó utilizando el aparato LightCycler® 480 bajo las condiciones siguientes. Cada pocillo de reacción en primer lugar se calentó a 91°C y se enfrió rápidamente a 40°C para permitir que tuviese lugar la hibridación. A continuación se elevó continuamente la temperatura a una tasa de incremento de 0,06°C/s hasta 90°C. La detección de la fusión de los dúplex de ADN se realizó a partir del cambio de la fluorescencia del pigmento ligante de ADN de doble cadena Syto-13 (concentración final: 100 µM).

50 Los resultados del experimento se muestran en la figura 4, en la que el panel superior muestra la fluorescencia absoluta en un gráfico como función de la temperatura e ilustrando el panel superior los mismos datos de la curva de fusión, aunque mostrando los datos como un gráfico de primera derivada (como función de la temperatura). Sólo se observó una pequeña diferencia en la temperatura de fusión entre el oligonucleótido de control y los oligonucleótidos que contenían N²-bencil-dG, con valores de ΔT_f de entre 0,3°C y 0,5°C. De esta manera, la presencia de N²-bencil-dG en un oligonucleótido no conduce a una desestabilización significativa de un dúplex de hibridación formado entre el oligonucleótido que contiene N²-bencil-dG y una secuencia de ácidos nucleicos complementaria. El presente experimento demuestra que puede incorporarse N²-bencil-dG dentro de una sonda oligonucleótida (por ejemplo una sonda TaqMan®) sin afectar negativamente las propiedades de hibridación de la sonda.

Ejemplo 3: eficiencia de corte

Con el fin de investigar si una sonda oligonucleótida 5'-nucleasa que contiene N²-bencil-dG puede ser cortada eficazmente por la actividad de nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa en un ensayo de PCR TaqMan®, se llevó a cabo el experimento a continuación. Las sondas TaqMan® con diana en secuencias víricas específicas en VIH-1, VIH-2, VHB y VHC se modificaron para que contuviesen un residuo de N²-bencil-dG. A continuación, se comparó cada una de las sondas TaqMan® modificadas con su sonda contrapartida TaqMan® no modificada en un ensayo de PCR cinética estándar utilizando cebadores específicos de diana y ADN polimerasa Z05 para su capacidad de detección de amplicón que indica la eficacia con que la sonda es cortada por la actividad de nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa.

Se muestran los resultados en la figura 5 representados como curvas de crecimiento para cada reacción de PCR con la fluorescencia representada frente al número de ciclos de la PCR. Para cada diana existe poca o ninguna diferencia entre las curvas de crecimiento generadas utilizando sondas TaqMan® modificadas con N²-bencil-dG y las que utilizan sondas TaqMan® no modificadas. Lo anterior demuestra que la eficiencia de corte por parte de la ADN polimerasa de las sondas TaqMan® que contienen N²-bencil-dG es la misma que la de una sonda TaqMan® que no contiene N²-bencil-dG.

Ejemplo 4: reducción de falsos positivos

Durante un ensayo de PCR multiplex, se observó que aparecían datos falsos positivos como resultado de la amplificación no específica en un canal que contenía una sonda TaqMan® específica de VHC marcada con el pigmento fluorescente JA270. Tal como se muestra en la Tabla 1, la incorporación de N²-bencil-dG en la sonda TaqMan® de VHC pudo eliminar la presencia de la señal de falsos positivos en el canal JA270 (canal 3).

Tabla 1

Resumen de muestras	Matriz	Réplicas	Reactivos inesperados (falsos positivos)	
			Canal 3	Global
Sondas de control	NHP	120	3	3%
Sondas bencil-dG	NHP	120	0	0%

Ejemplo 5: reducción de falsos positivos en un ensayo de PCR multiplex

Con el fin de mostrar el potencial de la modificación de N²-bencil-dG de las sondas TaqMan® como medio para reducir los falsos positivos, se llevó a cabo un experimento en el que se midió la tasa de falsos positivos utilizando sondas convencionales y aquellas con N²-bencil-dG en localizaciones específicas dentro de las secuencias de la sonda. Debido a que la falsa positividad es relativamente infrecuente en sistemas de amplificación altamente optimizados, se desarrolla una mezcla maestra de PCR modificada que favorecía la generación de productos de amplificación no específicos. En este sistema modelo, pudo inducirse un nivel elevado de falsa positividad de manera que resultase evidente una diferencia estadísticamente significativa entre las tasas a partir de un número relativamente limitado de muestras de entrada.

Se procesaron muestras de plasma humano normal (PHN, 850 µl cada uno, N=388 para cada condición sometida a ensayo) que habían sido previamente confirmadas como negativas para los virus que debían detectarse: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB), utilizando un sistema automatizado de preparación y amplificación de ADN (Roche Pilot System). Los eluidos de cada muestra sometidos al sistema de preparación de muestras se recogieron y distribuyeron (25 µl en cada pocillo) en placas de amplificación para la detección mediante PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan®. A continuación se añadieron 25 µl de una mezcla maestra activada (acetato de manganeso 6,6 mM, pH 6,1, acetato sódico 0,036 mM, DMSO al 10,8%, acetato sódico 0,054 mM, pH 7,0, acetato potásico 240 mM, pH 7,0, glicerol al 6%, tricina 120 mM, pH 8,0, 0,4 U/ml de UNG, dGTP 800 mM, dATP 800 mM, dCTP 800 mM, dUTP 1.600 mM, 1,8 U/ml de ADN polimerasa Z05-D) que contenía cebadores directos e inversos y sondas TaqMan® con o sin N²-bencil-dG, llevando el volumen de reacción final a 50 µl y las placas se sellaron y se introdujeron en el termociclador. El perfil de termociclado se llevó a cabo tal como se muestra a continuación, en la Tabla 2.

Tabla 2

Modo		Temperatura (°C)	Modo de adquisición	Meseta (hh:mm:ss)	Medición (hh:mm:ss)	Tasa de cambio (°C/s)	Ciclos
Pre-PCR	Etapa de UNG	50	-	00:02:00	00:00:00	2.2	1
	Desnaturalización de UNG/molde	94	-	00:00:05	00:00:00	4.4	

	Etapa a TA	55	-	00:02:00	00:00:00	2.2	
		60	-	00:06:00	00:00:00	4.4	
		65	-	00:04:00	00:00:00	4.4	
1. Medición		95	-	00:00:05	00:00:00	4.4	5
		55	Sencillo	00:00:30	00:00:08	2.2	
2. Medición		91	-	00:00:05	00:00:00	4.4	45
		58	Sencillo	00:00:25	00:00:08	2.2	
Enfriamiento		40	-	00:02:00	00:00:00	2.2	1

5 Las secuencias de cebador directo e inverso utilizadas en el experimento presentaban concentraciones finales comprendidas entre 0,125 μM y 0,3 μM y se seleccionaron de entre las siguientes. SEC ID nº 9 a 24 para VIH de tipo 1 (VIH-1) GAG; SEC ID nº 25 a 32 para LTR de VIH; SEC ID nº 33 a 35 para VIH de tipo 2 (VIH-2); SEC ID nº 36 y 37 para el VHB; SEC ID nº 38 a 59 del VHC.

10 Las secuencias de sonda TaqMan® utilizadas en el experimento presentaban concentraciones finales comprendidas entre 0,15 μM y 0,3 μM y se seleccionaron de entre las siguientes. SEC ID nº 60 a 64 para VIH-1 GAG; SEC ID nº 65 a 66 para LTR de VIH; SEC ID nº 67 para VIH-2; SEC ID nº 68 para el VHB; SEC ID nº 69 a 76 para el VHC. Todas las sondas se marcaron en el extremo 5' con un pigmento fluorescente: FAM para las sondas de VIH (tanto VIH-1 como VIH-2), HEX para la sonda de VHB, y JA270 para la sonda de VHC, y contenían una molécula inhibidora BHQ-2 interna.

15 Para las sondas TaqMan® que contenían el nucleótido modificado N²-bencil-dG, un residuo interno desoxiguanosina situado aproximadamente en una posición que es intermedia en la sonda se modificó de dG a N²-bencil-dG. Por ejemplo, en la sonda de VIH-2 (SEC ID nº 67), el residuo dG en la posición 12 desde el extremo 5'-terminal se convirtió en N²-bencil-dG. De manera similar, para la sonda del VHB (SEC ID nº 68) se introdujo N²-bencil-dG en la posición 20 desde el extremo 5'.

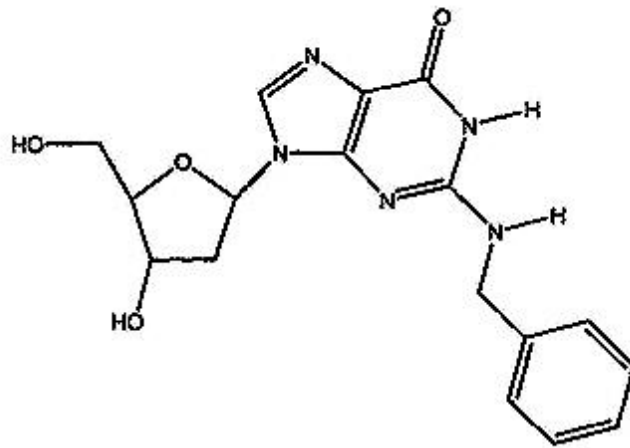
20 Los resultados del experimento indicados anteriormente para la reducción de la falsa positividad por N²-bencil-dG son los siguientes. En los ensayos con sondas convencionales (es decir, sin N²-bencil-dG), no se detectó señal de FAM (para la detección del VIH-1 y VIH-2), una señal de HEX (para la detección del VHB) y 39 señales JA270 (para la detección del VHC) de entre 388 muestras. Lo anterior condujo a una tasa de falsa positividad de 10,3% y una especificidad de 348/388, o 89,7%. En los ensayos con sondas N²-bencil-dG, no se detectó señal de FAM, una señal de HEX y 19 señales de JA270, conduciendo a una tasa de falsa positividad de 5,15% y una especificidad de 368/388, o 94,85%. Por lo tanto, la incorporación de N²-bencil-dG en la sonda TaqMan® del VHC resultó en una
25 reducción de 50% de la señal de falsos positivos en el canal JA270.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para impedir la extensión por una ADN polimerasa termoestable de un oligonucleótido cebador que se hibrida con una secuencia de nucleótidos molde en un ensayo que utiliza la extensión de un cebador de una manera dependiente del molde, en el que el ensayo se selecciona de entre el grupo que consiste de amplificación por PCR, secuenciación del ADN y genotipado, que comprende incorporar un nucleótido N²-bencil-desoxiguanosina (N²-bencil-dG) en la secuencia de nucleótidos molde, en el que el oligonucleótido cebador no puede ser extendido en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del nucleótido N²-bencil-dG.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el ensayo es la amplificación por PCR.
- 15 3. Método para reducir o impedir la amplificación no específica de ácidos nucleicos durante una reacción de amplificación que comprende proporcionar por lo menos una pareja de oligonucleótidos cebadores capaz de amplificar una secuencia diana de ácidos nucleicos, proporcionar una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG que bloquea la extensión del oligonucleótido cebador por una ADN polimerasa en más de 2 nucleótidos más allá de la posición del nucleótido N²-bencil-dG, al hibridarse el cebador oligonucleótido con la sonda oligonucleótida.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en el que la reacción de amplificación es un ensayo de PCR TaqMan y la sonda oligonucleótida es una sonda nucleasa 5'.
5. Mezcla de reacción para la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende por lo menos una pareja de cebadores oligonucleótidos y por lo menos una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG.
- 25 6. Mezcla de reacción según la reivindicación 5, que comprende además un biocatalizador incorporador de nucleótidos, nucleósidos trifosfato y un tampón adecuado para la amplificación de ácidos nucleicos por el biocatalizador que incorpora nucleótidos.
- 30 7. Kit para la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende por lo menos una pareja de cebadores oligonucleótidos, por lo menos una sonda oligonucleótida que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG, por lo menos un biocatalizador que incorpora nucleótidos, nucleósidos trifosfato, un tampón adecuado para la amplificación de ácidos nucleicos por como mínimo un biocatalizador que incorpora nucleótidos, y un juego de instrucciones para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos.
- 35 8. Kit según la reivindicación 7, que comprende además una o más parejas de oligonucleótidos cebadores y dos o más sondas oligonucleótidas que incorpora un nucleótido N²-bencil-dG.

FIGURA 1

(A)



(B)

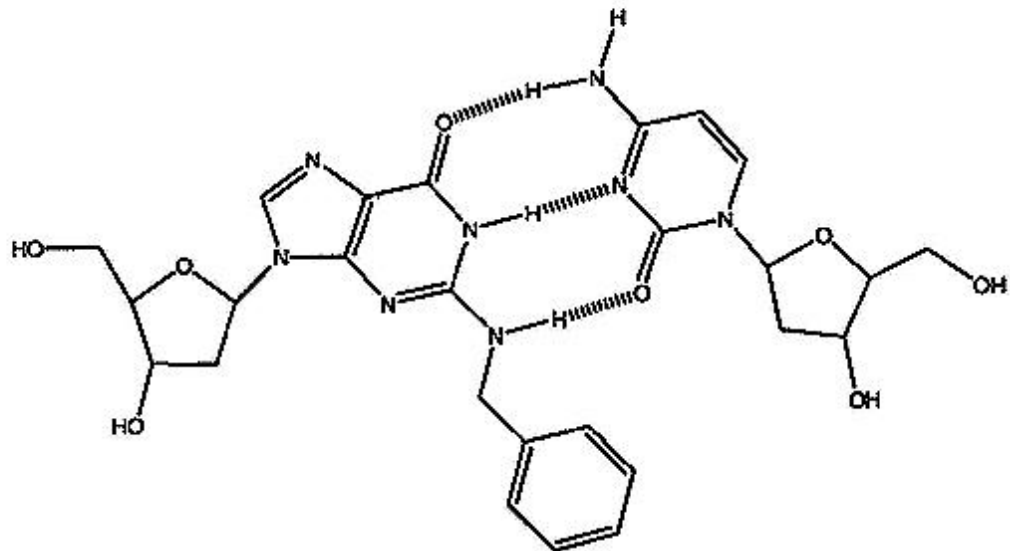


FIGURA 2

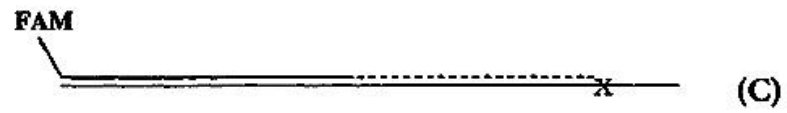
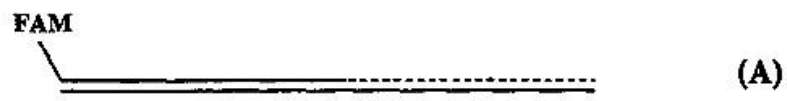


FIGURA 3A-1

Reacción de extensión: sin enzima, 0 min - molde de control

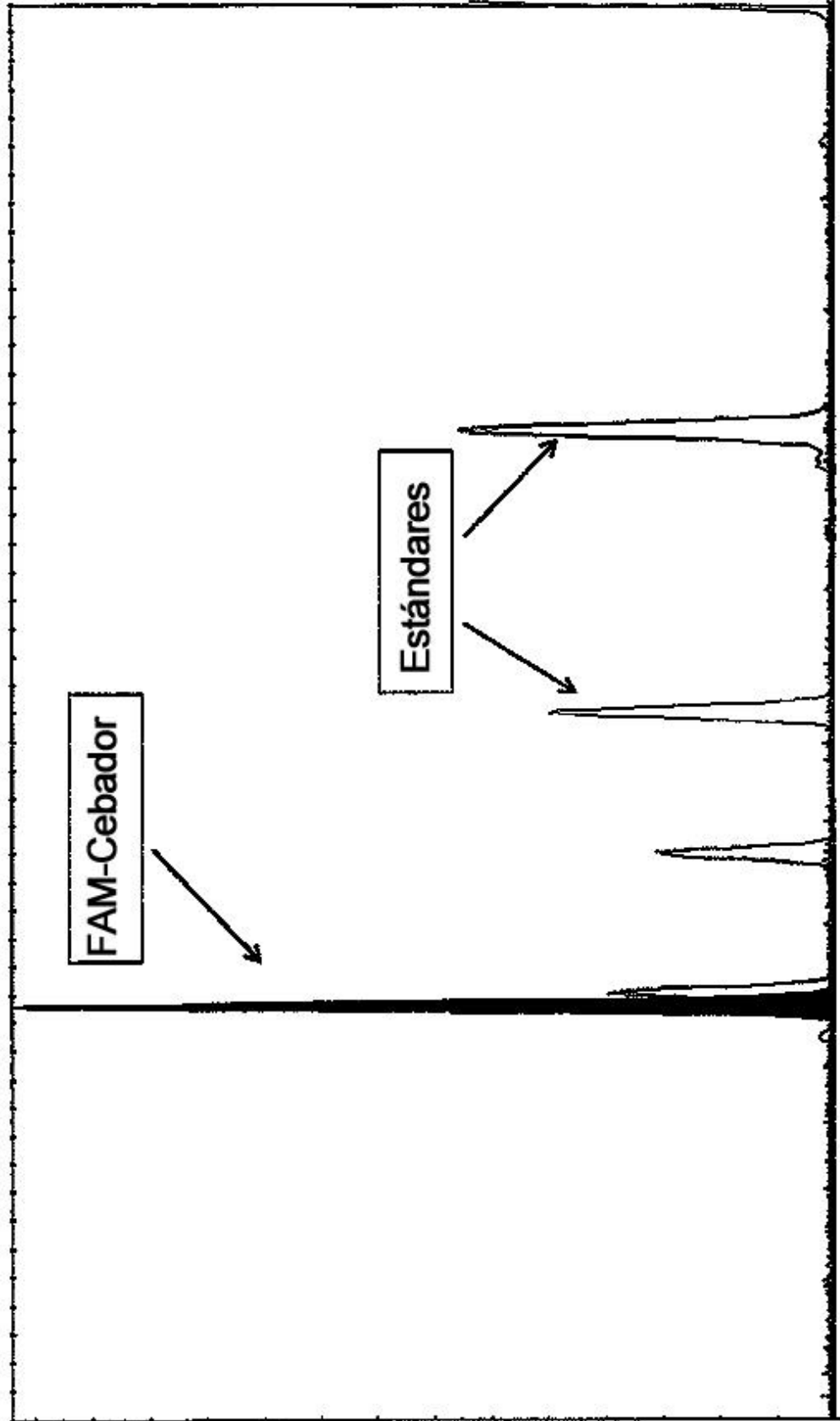


FIGURA 3A-2

Reacción de extensión: sin enzima, 0 min - molde NJS339_1A

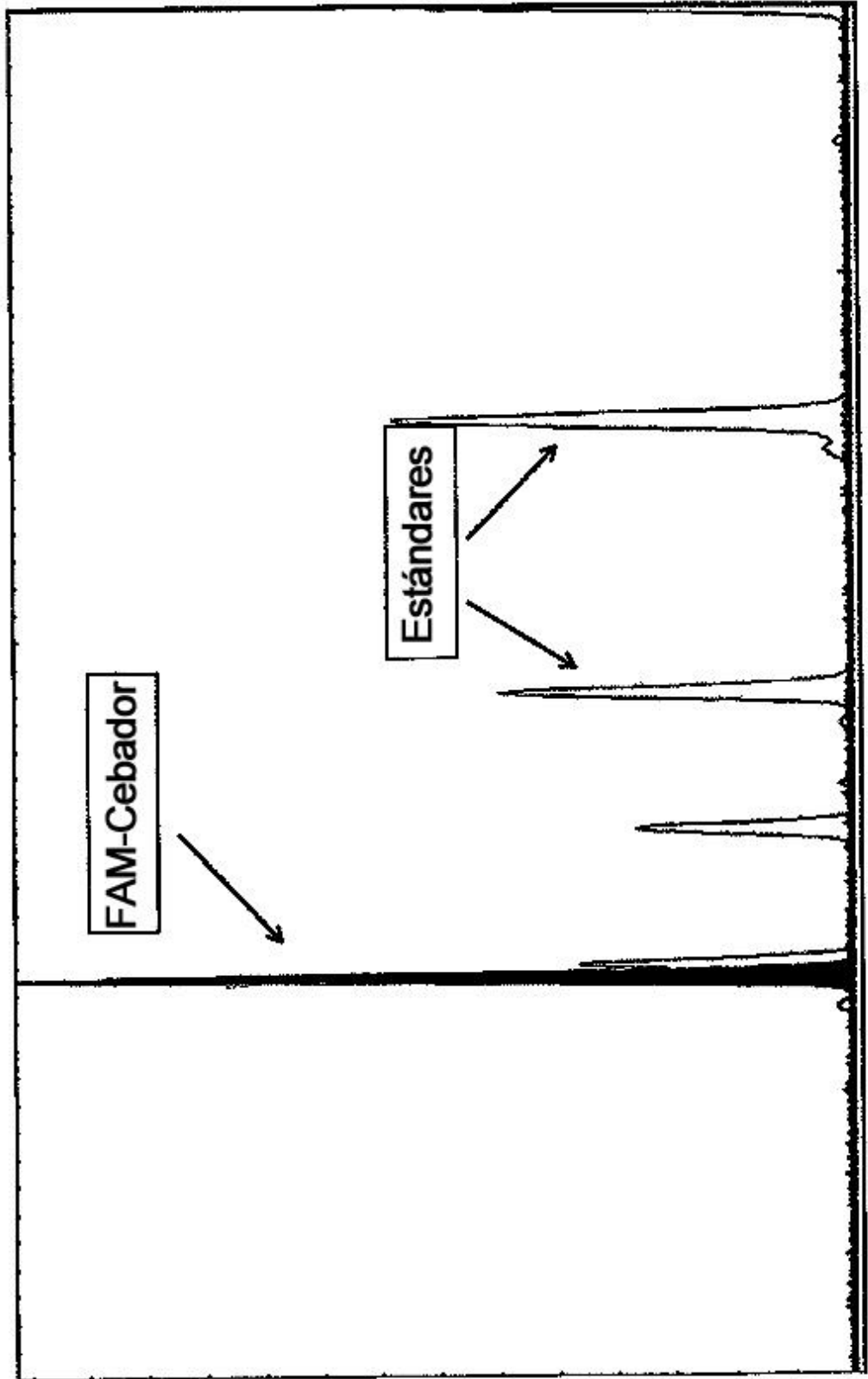


FIGURA 3A-3

Reacción de extensión: sin enzima, 0 min - Molde NJS339_2A

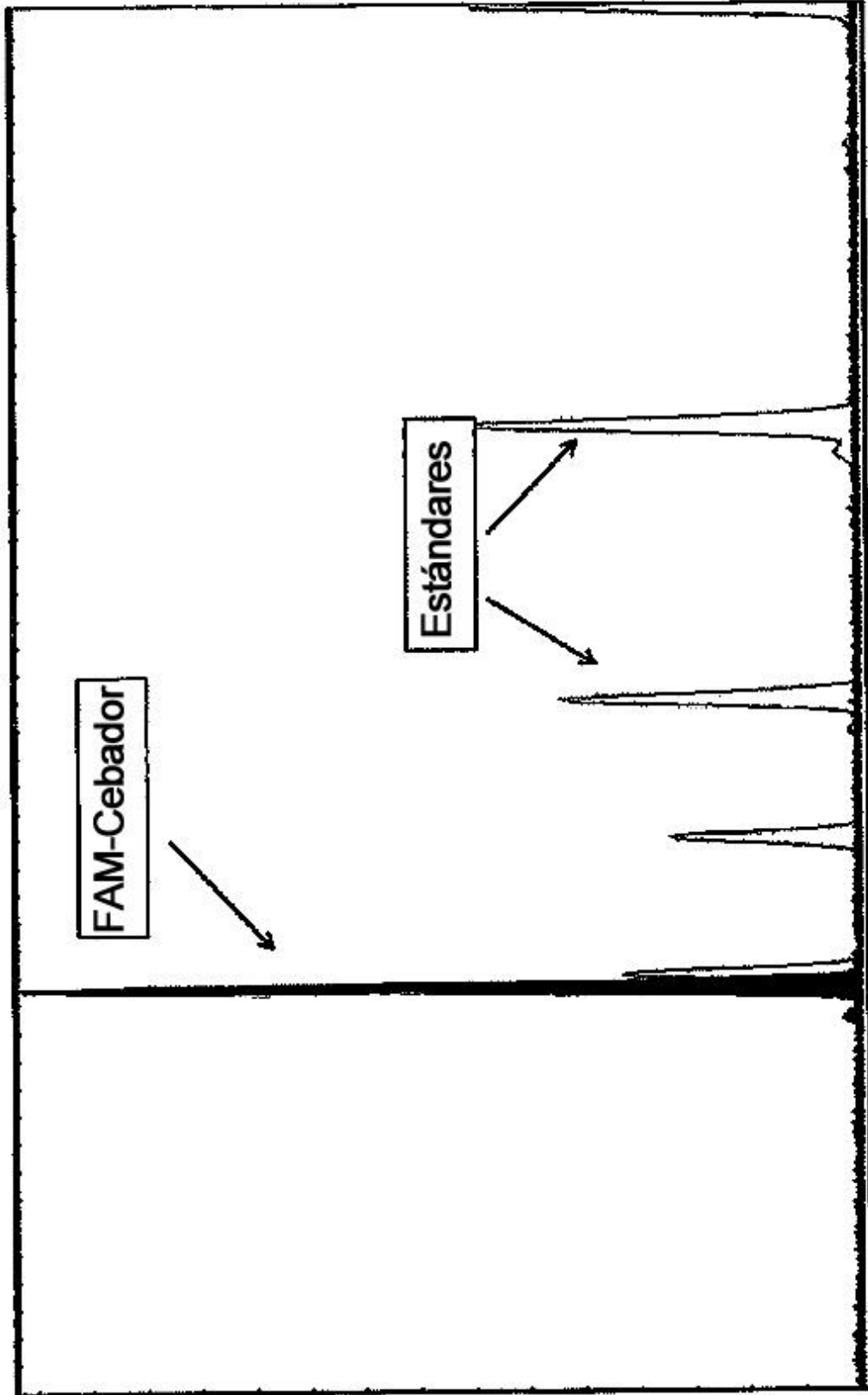


FIGURA 3B-1

Reacción de extensión: 5 min - molde de control

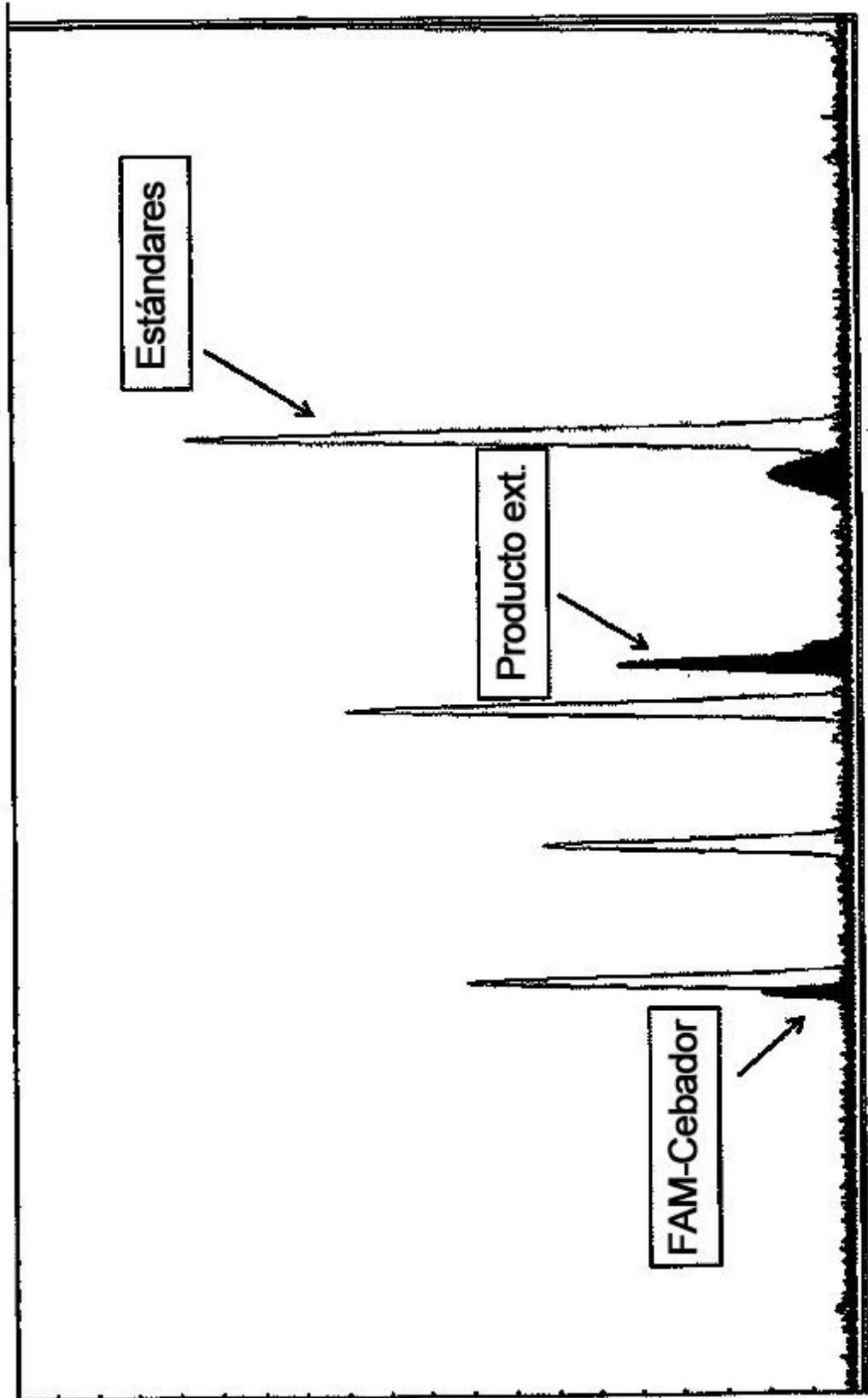


FIGURA 3B-2
Reacción de extensión: 5 min - Molde NJS339_1A

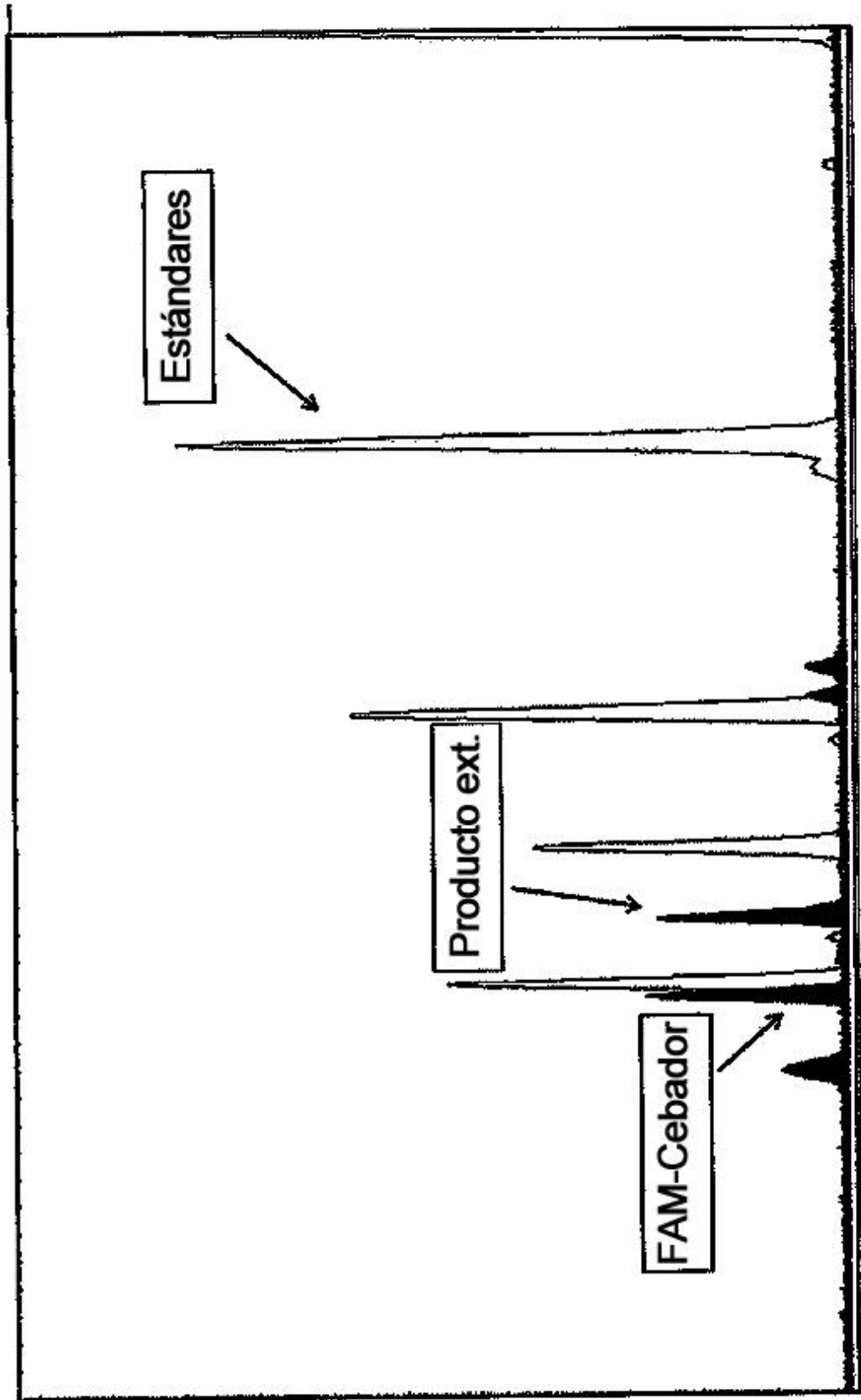


FIGURA 3B-3

Reacción de extensión: 5 min - Molde NJS339_2A

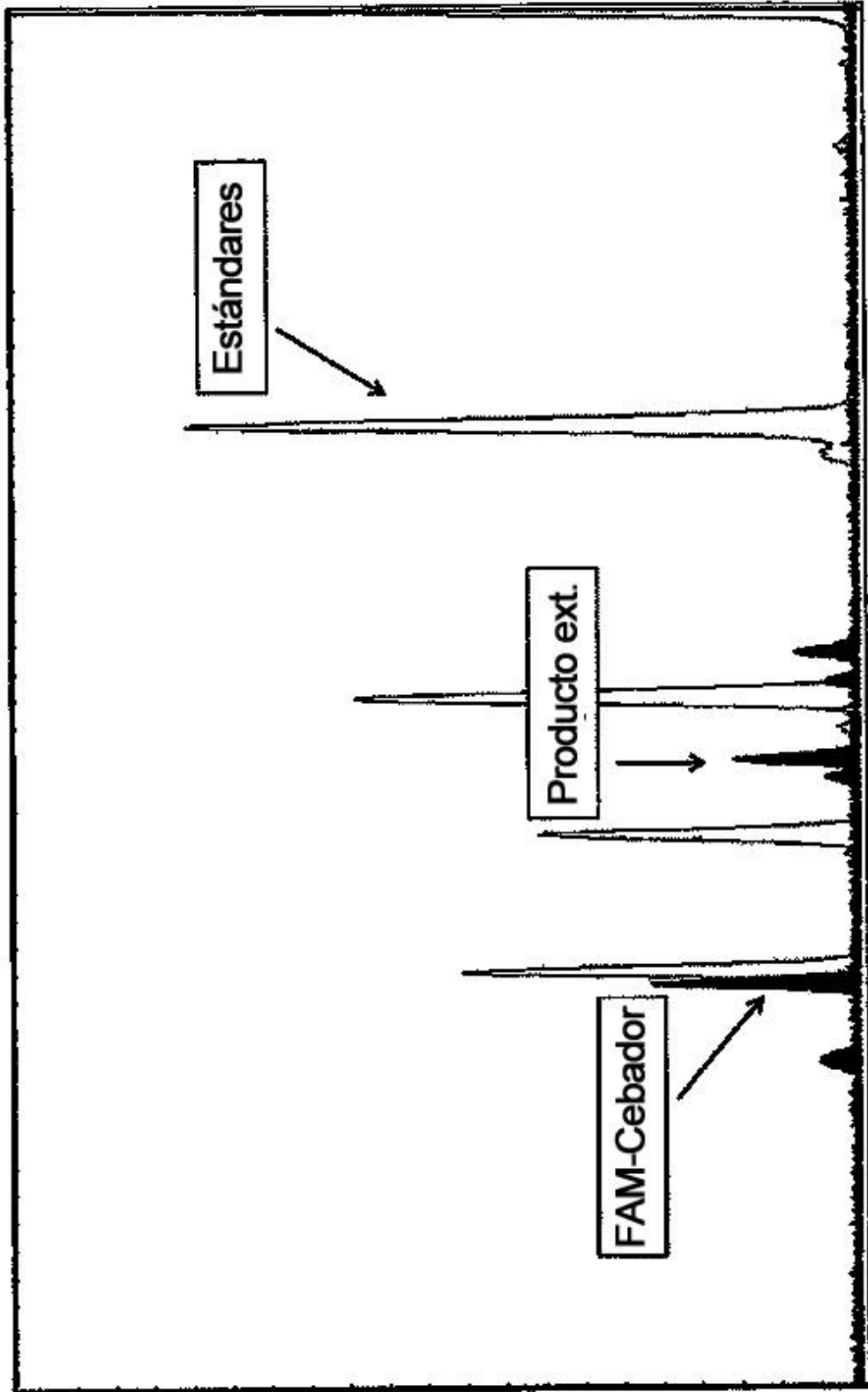


FIGURA 4

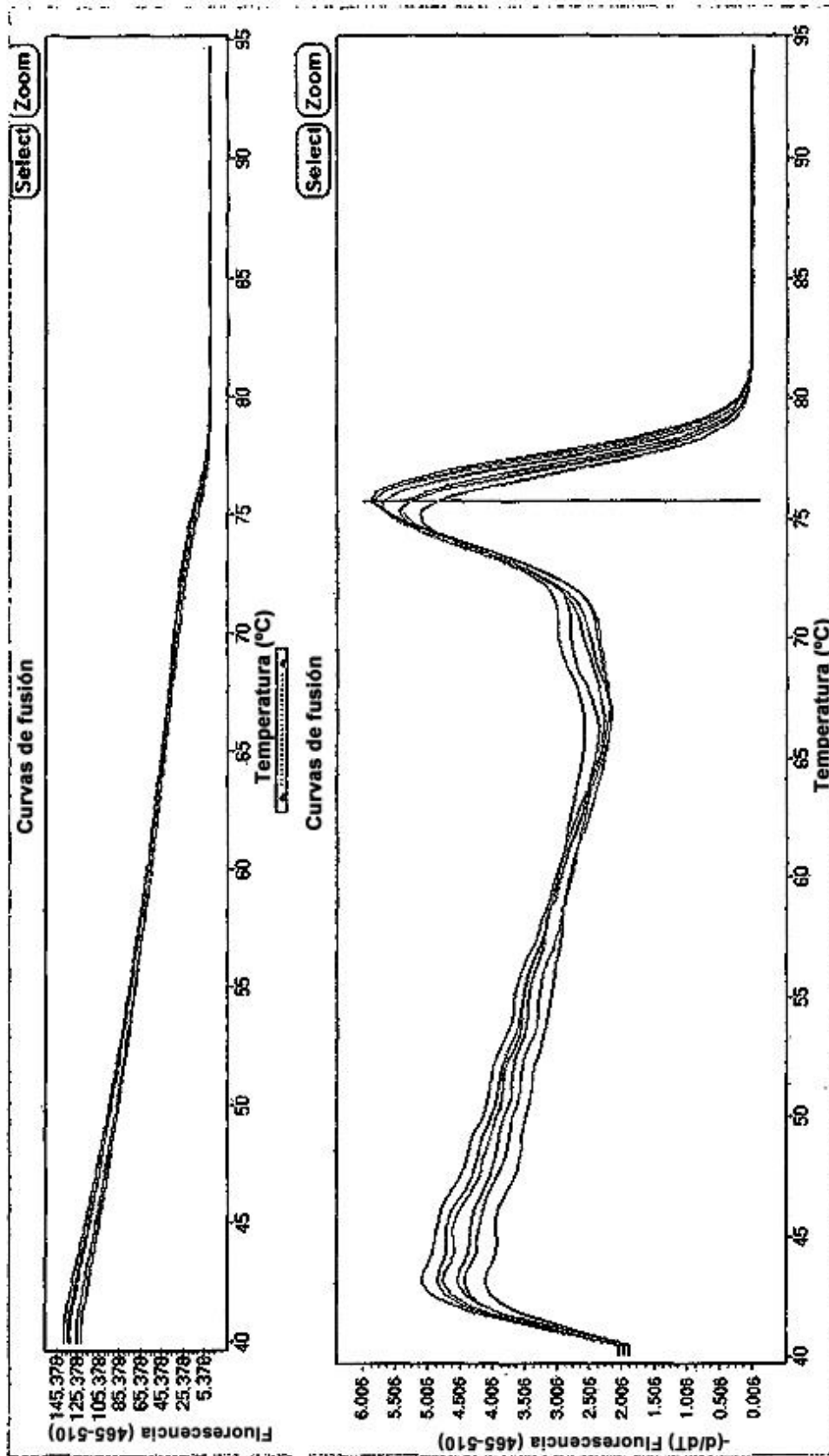


FIGURA 5A

VIIH-1M

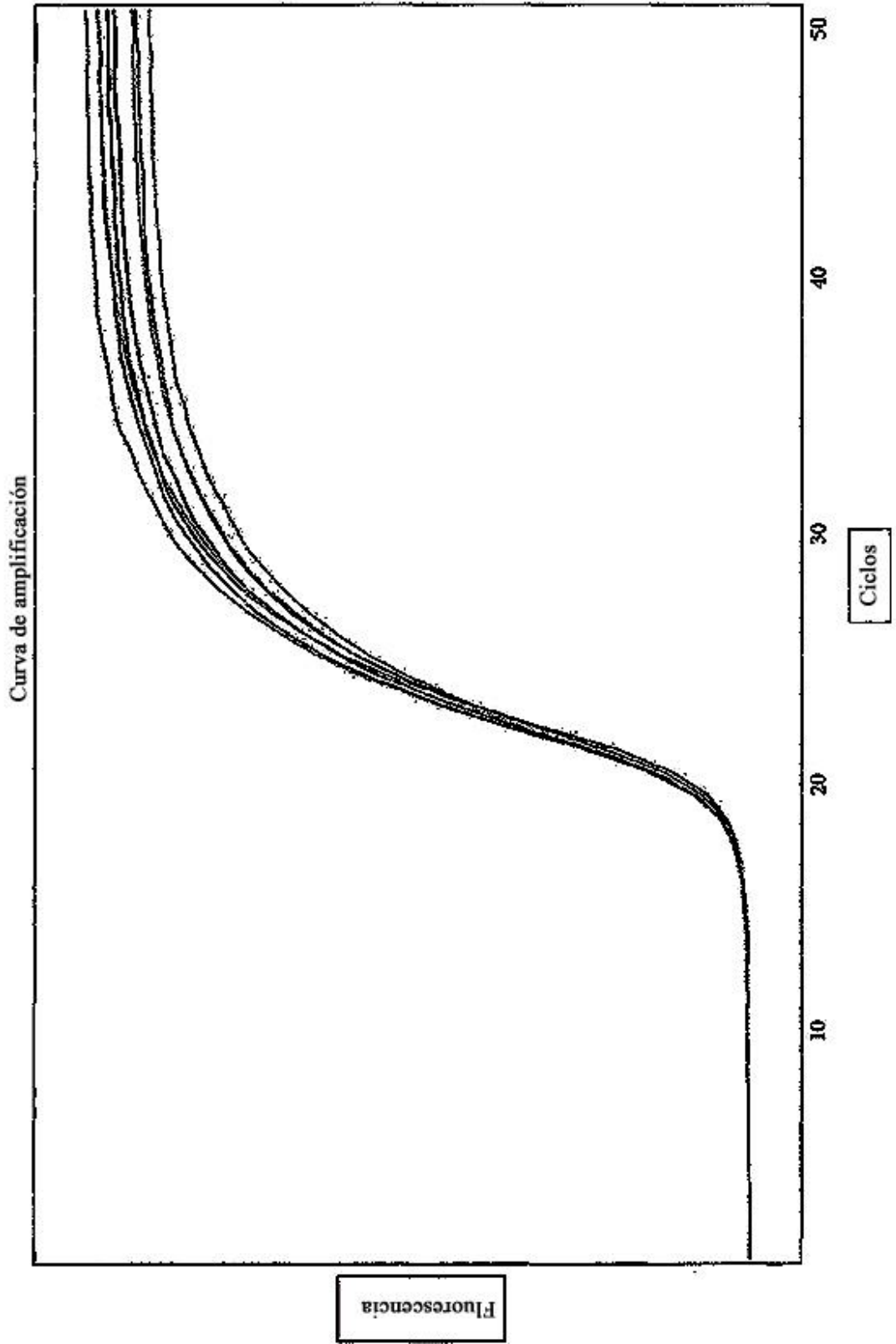


FIGURA 5B

VHB

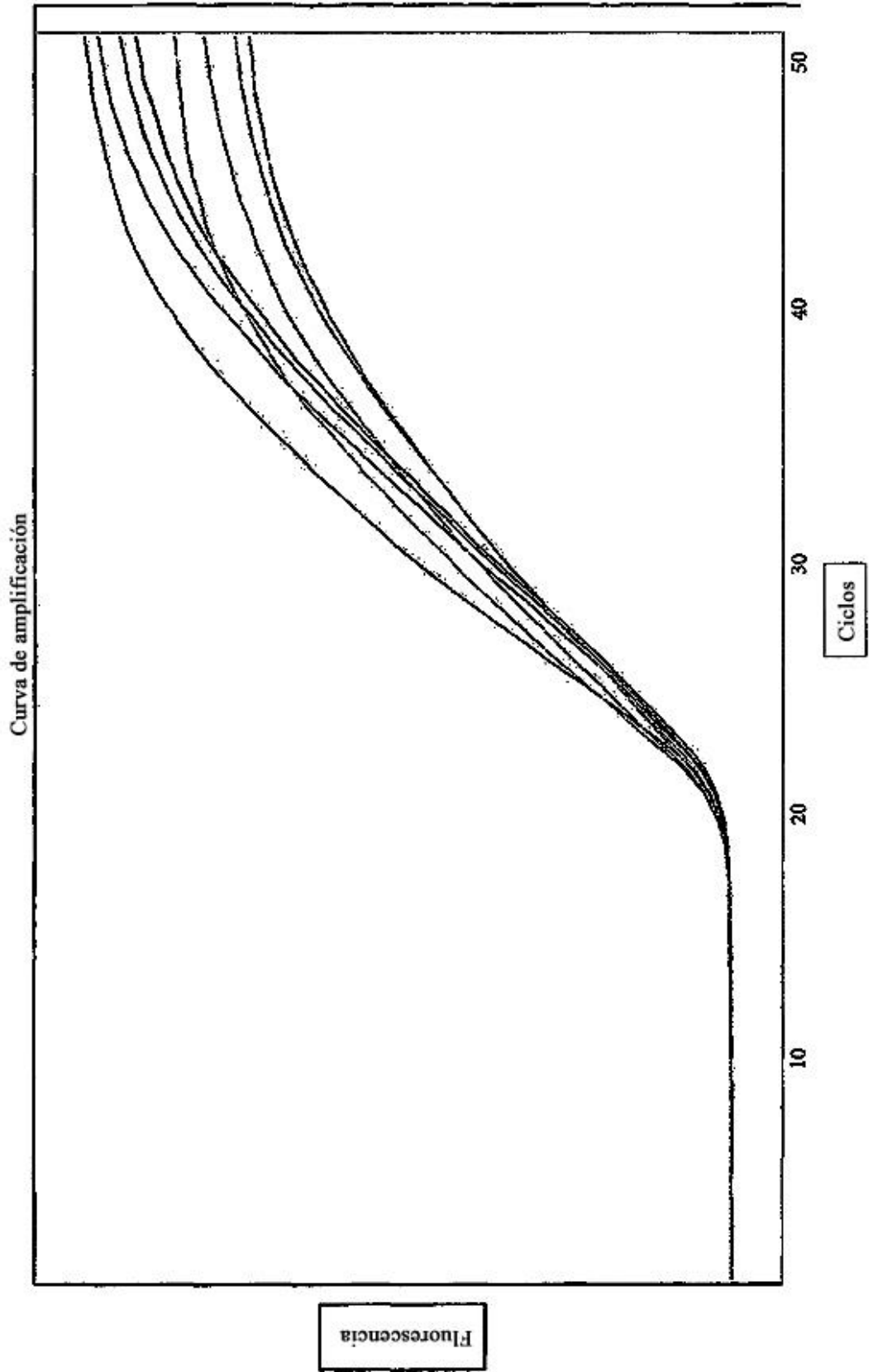


FIGURA 5C

VHC

Curva de amplificación

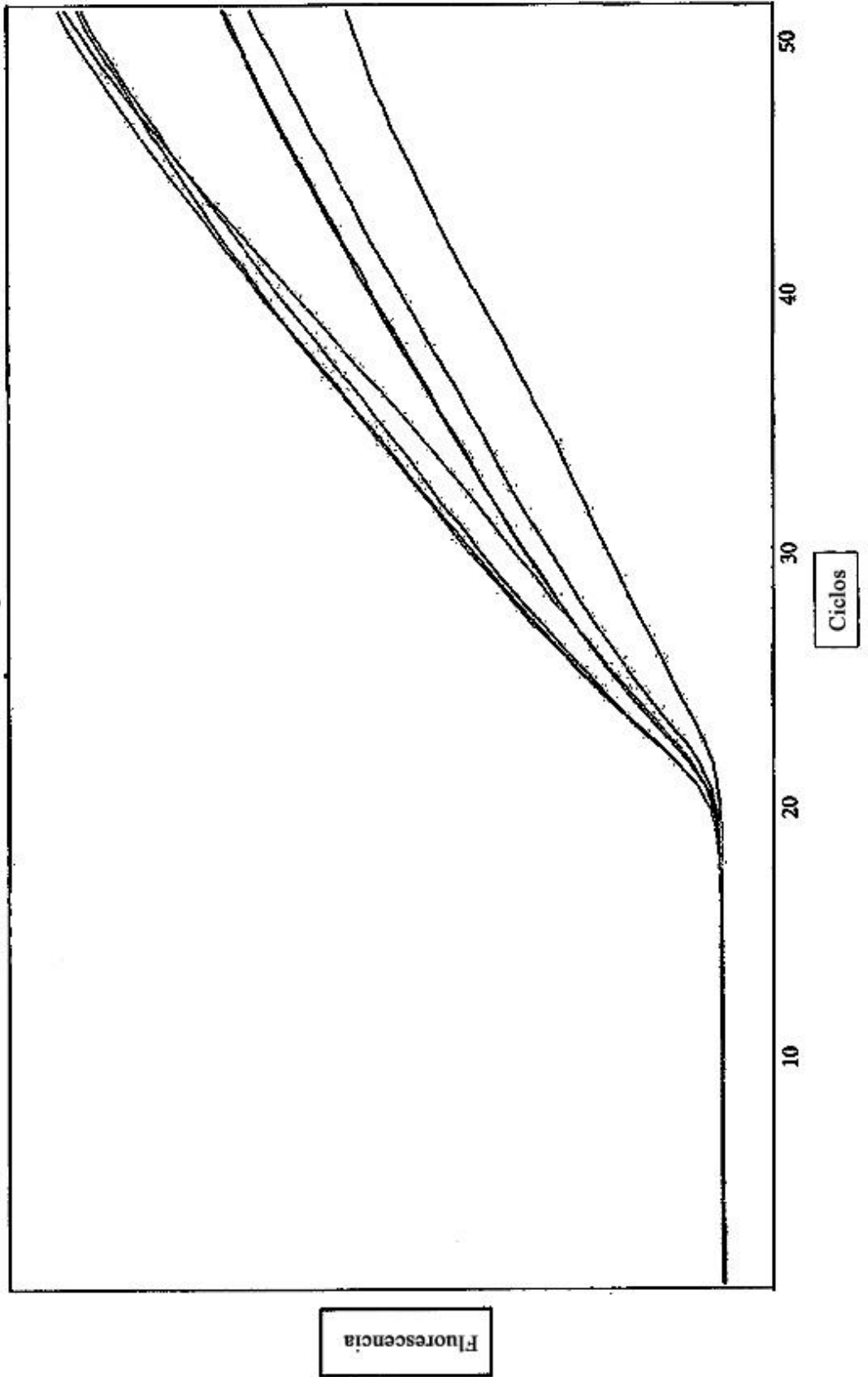


FIGURA 5D

VIH-2

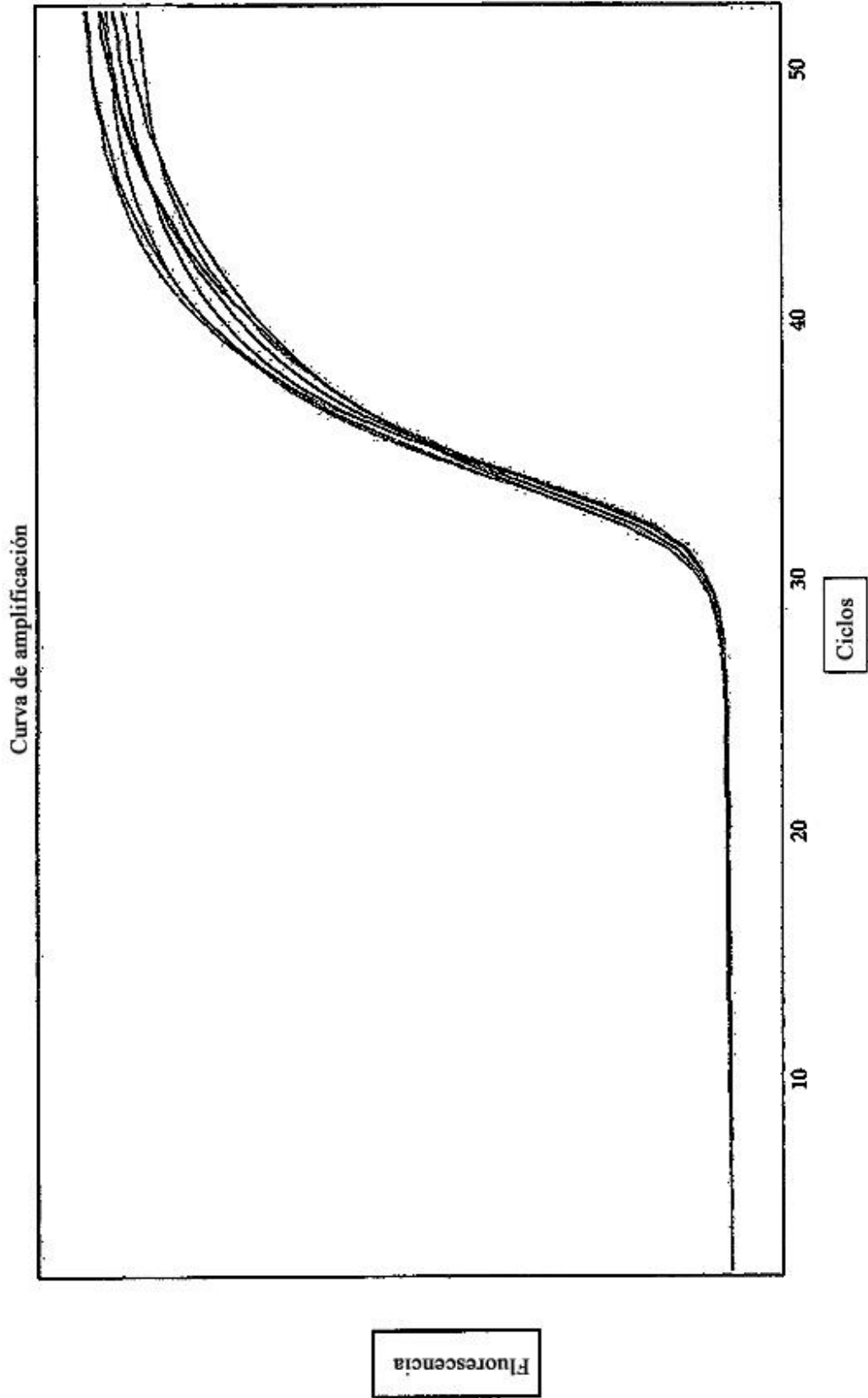


FIGURA 5E

