

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 237**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2008 PCT/IL2008/000918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09004630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008 E 08763674 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2162551**

54 Título: **Cebadores químicos para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mejoradas**

30 Prioridad:

**03.07.2007 US 947685 P**

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

**20.12.2017**

73 Titular/es:

**GENAPHORA LTD. (100.0%)  
4 Habarzel Street  
69710 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**PELEG, OFER**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

**ES 2 647 237 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

Cebadores quiméricos para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mejoradas

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la amplificación de ácidos nucleicos. En particular, la presente invención se refiere al uso de ribonucleótidos en cebadores y sondas de ADN en la reducción de productos no específicos en reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) puede producirse la generación de productos de amplificación no específicos. Los artefactos se derivan de productos de hibridación inapropiados designados como dímeros de cebador (Rychlik, 1995) y dímeros de cebador-sonda, que son resultado de interacciones débiles entre cebadores o cebadores y sondas tales como TaqMan™ y sondas de baliza molecular. Los productos no deseados se forman como resultado de una complementariedad débil entre los extremos 3' de un cebador con respecto a bases en cadenas de oligonucleótidos no diana en la mezcla de reacción. Esto permite la hibridación del cebador a la cadena no diana, seguido de la iniciación y la elongación del dímero no específico por la ADN polimerasa termoestable y conduce a una amplificación eficiente de este subproducto no deseado.

En la PCR en tiempo real, este problema empeora debido a la aparición de subproductos no específicos que enmascaran la detección de bajas concentraciones de la secuencia diana después de 30 ciclos (Watson, 1989) en caso de complementariedad de al menos un nucleótido en el extremo 3', y después del ciclo 40 en caso de ninguna complementariedad 3' en absoluto. Este problema se magnifica en las reacciones de amplificación por PCR múltiple y qPCR debido a la presencia de varios conjuntos de cebadores y sondas en la mezcla de reacción, lo que conduce a una sensibilidad y calidad deterioradas de la reacción. El análisis de fusión de alta resolución (HRM), que requiere una amplificación anterior de la secuencia diana a un número de copias alto, es especialmente sensible a la pureza de la muestra. La presencia de artefactos posteriores a la amplificación, tales como dímeros de cebadores o subproductos no específicos, puede dificultar la interpretación de los resultados de la HRM. "Walder R.Y. et al.: "Use of PCR Primers Containing a 3'-Terminal Ribose Residue to Prevent Cross-Contamination of Amplified Sequences" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21(18), 1993, páginas 4339-4343" describen un método por PCR que emplea cebadores quiméricos por lo que los cebadores tienen un residuo de ribosa 3'-terminal. Se descubrió que los cebadores quiméricos tienen sustancialmente la misma eficiencia de amplificación que los cebadores de ADN y que son útiles para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Ferrie et al. (1992) demostraron que, bajo condiciones de arranque en frío, cada combinación posible de dos cebadores diferentes en una reacción múltiple generará dímeros de cebador, independientemente de cualquier complementariedad de cebador.

Los productos de amplificación no específicos pueden reducirse mediante un diseño cuidadoso de cebadores, el uso de protocolos de PCR rigurosos (Don et al., 1991) y el uso de enzimas de "inicio en caliente" (Chou et al., 1992; D'Aquila et al., 1991; TaqMan™ PCR Reagent Kit Protocol, P. E. Applied Biosystems). Sin embargo, las enzimas de inicio en caliente se "fugan" y aparentemente no hay enzimas absolutas de inicio en caliente.

Se han descrito varios métodos para la reducción de productos de amplificación no específicos en PCR: la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0175769 describe el uso de poli-hidroxi-aril-poli-ácido con 3-6 restos ácido orto-hidroxi como un aditivo a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que puede dar como resultado la prevención de la formación de dímeros de cebadores. La Solicitud de Patente Europea EP 0866071 y la Solicitud PCT WO 2006/112818 describen el uso de nucleótidos modificados covalentemente en o cerca del extremo 3' del cebador para la reducción de productos de amplificación no específicos, en particular dímeros de cebadores.

La Solicitud de Patente Europea EP 1201768 describe métodos y reactivos para reducir la amplificación no específica que implica el uso de cebadores oligonucleotídicos en los que al menos uno de los 3 nucleótidos en el extremo 3' del cebador es un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en 2'-O-amino-metil-nucleótidos, 2'-amino-metil-nucleótidos, 2'-fluoro-nucleótidos y arabinosa nucleótidos.

La Pat. de Estados Unidos N.º 7.205.129 y la Solicitud PCT WO 01/64952 describen el uso de un método para la reducción de artefactos durante la amplificación de ácidos nucleicos basándose en el uso de oligonucleótidos deficientes en plantilla como cebadores. Estos oligonucleótidos deficientes en plantilla comprenden nucleótidos

deficientes en plantilla, preferiblemente en o cerca del extremo 5'. Estos nucleótidos deficientes en plantilla, que pueden ser nucleótidos modificados, nucleótidos derivatizados, análogos de nucleótidos o ribonucleótidos, no pueden servir como plantillas para la síntesis de ácidos nucleicos, es decir, evitan la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria a una cadena de ácido nucleico que contiene un nucleótido deficiente en plantilla en o más allá del sitio del nucleótido deficiente en plantilla. En otras palabras, los cebadores oligonucleotídicos deficientes en plantilla descritos en los documentos US 7.205.129 y WO 01/64952 no pueden replicarse completamente. Los documentos US 7.205.129 y WO 01/64952 muestran la presente invención mediante el bloqueo de la elongación del ADN en o más allá del sitio de un nucleótido deficiente en plantilla.

10 La situación estándar en la que los cebadores no experimentan ninguna modificación delimita la sensibilidad de detección de los ensayos que dependen de la amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN, tal como qPCR y HRM. El aspecto de los productos de amplificación después del ciclo 30 se define como una "zona crepuscular". La detección es cuestionable y son necesarios más exámenes tal como el análisis de Tm (temperatura de fusión) y la secuenciación del producto.

15 El bloqueo de la formación de productos independientes de plantilla no específicos evitará la inactivación del cebador y la desviación de la reacción hacia la formación de subproductos no informativos. La eliminación o cualquier postergación en la aparición de productos independientes de plantilla no específicos en reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN debería aumentar la robustez, especificidad y sensibilidad de la reacción.

20 Los métodos existentes para eliminar o reducir artefactos en reacciones de amplificación de ácido nucleico implican modificaciones químicas o inserción de extensiones de bases de ARN (por encima de 2 bases en una fila) en cebadores, que requieren reacciones químicas enzimáticas específicas u otras, complicadas, o modificar los nucleótidos en el extremo 5' de los cebadores para permitir un cebado suficiente.

Por lo tanto, existe la necesidad insatisfecha de métodos más sencillos, más eficaces y más económicos para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mejoradas y especialmente para aplicaciones de PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución con mejor especificidad y sensibilidad.

30

## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para la reducción o eliminación de productos de amplificación no específicos y otros artefactos producidos por aplicaciones de reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN *in vitro*, tales como, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y análisis de fusión de alta resolución (HRM). Más específicamente, la presente descripción proporciona materiales, kits y métodos para diseñar y usar cebadores quiméricos de ARN/ADN y sondas para reducir o eliminar productos de amplificación no específicos en reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN.

40

La presente invención reduce la formación de subproductos independientes de plantilla no específicos incrustando ribonucleótidos en la secuencia de ADN de cebadores y sondas de una manera no aleatoria, dispersos a lo largo de la longitud del cebador o sonda, preferiblemente no en el extremo 5', mientras que se evitan los fragmentos de ARN. El método de la presente invención impide la iniciación de la síntesis de ADN desde los sitios en los que se produce la modificación del ARN, pero permite la elongación del ADN más allá del sitio de modificación del ARN del cebador.

45

Ahora se ha descubierto que, sorprendentemente, la incorporación de solamente unos pocos ribonucleótidos en un cebador y/o sonda de ADN (es decir, una molécula quimérica de ARN/ADN) puede tener un impacto beneficioso en la reducción de la generación de artefactos no deseados producidos por las reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN *in vitro*, siempre que los ribonucleótidos no sean adyacentes. La incrustación de solamente unas pocas bases de ARN en cebadores y/o sondas de ADN es sencilla y no requiere ninguna adición enzimática especial ni manipulaciones químicas.

50

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, la invención se basa en parte en el hallazgo de que la presencia de bases de ARN en la cadena plantilla en la proximidad de la zona de iniciación reduce en gran medida la eficacia de la iniciación de la síntesis de ADN, mientras que la elongación del ADN de la cadena del cebador se ve menos afectada por bases de ARN incrustadas en la cadena plantilla, siempre que las bases de ARN no sean adyacentes. En el contexto de la presente invención, la zona de iniciación se define como el punto en el que comienza la síntesis de ADN en el dúplex cebador-plantilla.

55

Ahora se describe que la incorporación de bases de ARN en ubicaciones previamente diseñadas en cebadores y sondas de ADN disminuye significativamente la formación de productos de amplificación no específicos en reacciones de amplificación de ADN dependiente de ADN. En condiciones de reacción de amplificación estándar (es decir, cuando los cebadores y sondas contienen solamente ADN), los cebadores y las sondas pueden proporcionar una zona de iniciación funcional para una reacción inespecífica no deseada que da como resultado la amplificación del cebador, además de la amplificación de una secuencia diana deseada, debido al gran exceso de cebadores en la mezcla de reacción. Por el contrario, los cebadores y sondas quiméricos de ARN/ADN usados en la presente invención están diseñados para proporcionar una zona de iniciación no funcional cuando forman dúplex no específicos, dejando así el dúplex quimera de ARN/ADN-plantilla diana como la única zona de iniciación disponible en la mezcla de reacción. Sin embargo, dado que la elongación del ADN es posible incluso cuando algunos ribonucleótidos están incrustados en la plantilla, con la condición de que no estén presentes fragmentos de ARN como en los cebadores quiméricos de ARN/ADN usados en la presente invención, la amplificación de la secuencia diana proseguirá, aunque con eficiencia reducida.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método, como se define en las reivindicaciones, útil para la reducción o eliminación de productos independientes de plantilla no específicos en la amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN usando cebadores o sondas de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN, aumentando de este modo la especificidad y sensibilidad de la detección y cuantificación de la secuencia diana mediante PCR. De acuerdo con realizaciones alternativas, la amplificación se realiza usando iniciadores y sondas de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN.

La presente invención también proporciona kits, como se define en las reivindicaciones, útiles para la reducción o eliminación de productos independientes de plantilla no específicos en reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN, que comprenden cebadores quiméricos de ARN/ADN e ingredientes químicos necesarios y enzimas para su uso en reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN. De acuerdo con realizaciones alternativas, la amplificación se realiza usando iniciadores y sondas de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN. La presente invención proporciona un método para reducir o eliminar la formación de artefactos y productos de amplificación no específicos en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN. El método comprende usar al menos un oligonucleótido quimérico de ARN/ADN como cebador directo o inverso y una ADN polimerasa dependiente de ADN para amplificar una secuencia diana, y opcionalmente una o más sondas oligonucleotídicas, en el que el oligonucleótido quimérico comprende al menos un ribonucleótido; y en el que el número de ribonucleótidos localizados dentro de uno a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido quimérico permitirá el inicio de la síntesis de ADN y no evitará la elongación del ADN cuando el cebador forma un dúplex con la secuencia diana deseada e impedirá la iniciación de la síntesis de ADN a partir de dímeros de cebador-cebador o dímeros de cebador-sonda; y en el que no hay dos ribonucleótidos en el cebador adyacentes entre sí.

En algunas realizaciones, el cebador directo y el cebador inverso son ambos oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN.

En algunas realizaciones, todos los cebadores y sondas que se usan en la reacción de amplificación tienen una base idéntica a la base 3' terminal. En realizaciones preferidas, la base 3' terminal idéntica de los oligonucleótidos quiméricos se selecciona de A o T. En ciertas realizaciones, una base que es "complementaria" a dicha base en el extremo 3' de al menos un cebador quimérico, o una base adyacente a dicha base "complementaria", es un ribonucleótido. A modo de ejemplo, si la base terminal es una T, cada A en el cebador puede reemplazarse por un ribonucleótido, o puede colocarse un ribonucleótido adyacente a cada A en el cebador para impedir el inicio de la amplificación de cualquier dímero de cebador-cebador hipotético que pueda formarse.

En diversas realizaciones, cada cebador quimérico o sonda comprende al menos un ribonucleótido localizado en o dentro de uno a 5 nucleótidos aguas arriba o aguas abajo de al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o el extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción. En realizaciones preferidas, cada cebador quimérico o sonda comprende un ribonucleótido situado en o adyacente a al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción.

Los métodos de la presente invención se pueden usar en cualquier reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN y método de detección de productos de amplificación. En algunas realizaciones, la amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN se selecciona del grupo que consiste en amplificación de

círculo rodante exponencial (ERCA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación con Q $\beta$  replicasa y secuenciación cíclica. En realizaciones preferidas, la amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN es PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para realizar reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN. El kit utiliza los métodos y materiales descritos anteriormente y es útil para reducir o eliminar productos de amplificación no específicos en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN.

En algunas realizaciones, el kit comprende: (i) al menos un oligonucleótido quimérico de ARN/ADN como cebador directo o inverso, y opcionalmente una o más sondas oligonucleotídicas en el que el oligonucleótido quimérico comprende al menos un ribonucleótido, en el que el número y la composición de ribonucleótidos localizados dentro de uno a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido quimérico permitirán el inicio de la síntesis de ADN y no evitarán la elongación del ADN cuando el cebador forma un dúplex con la secuencia diana deseada e impedirán el inicio de la síntesis de ADN a partir de dímeros de cebador-cebador o dímeros de cebador-sonda, y en el que no hay dos ribonucleótidos en el cebador que estén adyacentes entre sí; (ii) una ADN polimerasa dependiente de ADN; y (iii) los reactivos y tampones necesarios para realizar la reacción de amplificación.

En algunas realizaciones, el cebador directo y el cebador inverso son ambos oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN.

En algunas realizaciones, todos los cebadores y sondas en el kit tienen una base idéntica a la base 3' terminal. En realizaciones preferidas, la base 3' terminal idéntica de los oligonucleótidos quiméricos se selecciona de A o T. En ciertas realizaciones, una base que es "complementaria" a dicha base en el extremo 3' de al menos un cebador quimérico, o una base adyacente a dicha base "complementaria", es un ribonucleótido.

En diversas realizaciones, cada cebador quimérico o sonda comprende al menos un ribonucleótido localizado en o dentro de uno a 5 nucleótidos aguas arriba o aguas abajo de al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o el extremo 3' de otro cebador o sonda en el kit. En realizaciones preferidas, cada cebador quimérico o sonda comprende un ribonucleótido situado en o adyacente a al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en el kit.

El kit se puede usar para realizar cualquier tipo de reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN. De acuerdo con diversas realizaciones, la amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN se selecciona del grupo que consiste en amplificación de círculo rodante exponencial (ERCA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación con Q $\beta$  replicasa y secuenciación cíclica.

En algunas realizaciones, el kit comprende además los medios para detectar productos de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, un marcador detectable, una sonda fluorogénica, o un colorante fluorescente aglutinante de surco menor.

La presente invención se comprenderá más completamente a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos a continuación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un diagrama que muestra cómo se produce el primer ciclo de una amplificación dependiente de plantilla usando cebadores quiméricos de ARN/ADN. La zona de iniciación (IN) y la zona de elongación (EL) están libres de bases de ARN embebidas. La secuencia plantilla (SEQ ID NO:1) es una secuencia hipotética y no tiene similitud significativa con las secuencias en la base de datos de nucleótidos NCBI. Las bases de ARN están en negrita.

La figura 2 es un diagrama que muestra cómo se produce el segundo ciclo de una amplificación dependiente de plantilla usando cebadores quiméricos de ARN/ADN. La zona de elongación (EL) contiene

bases de ARN. Las bases de ARN están en negrita.

La figura 3 es un diagrama que muestra cómo se produce el tercer ciclo de una amplificación dependiente de plantilla usando cebadores quiméricos de ARN/ADN. La zona de elongación (EL) contiene bases de ARN. Las bases de ARN están en negrita.

5 La figura 4 es un diagrama que muestra cómo se bloquea el inicio de la síntesis de ADN en un dímero de cebador quimérico de ARN/ADN. El inicio de la síntesis de ADN es ineficiente o imposible porque la zona de iniciación (IN) en ambas cadenas contiene una base de ARN. Las bases de ARN incrustadas están en negrita.

10 La figura 5 presenta los resultados de un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real del gen de ARN 16s de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) usando cebadores quiméricos de ARN/ADN y cebadores de ADN regulares.

15 La figura 6 muestra las diferencias en los valores de  $\Delta C(t)$  entre los productos de detección del gen de ARN 16s de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) usando cebadores quiméricos de ARN/ADN y cebadores de ADN regulares.  $\Delta C(t)$  se calcula aquí como la diferencia entre los valores  $C(t)$  de la muestra de plantilla con respecto a los valores  $C(t)$  del control no diana (NTC).

La figura 7 ilustra la mayor sensibilidad de un ensayo de detección de PCR cuantitativa en tiempo real del gen de ARN 16s de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) usando cebadores quiméricos de ARN/ADN (figura 7A) en comparación con cebadores de ADN regulares (figura 7B).

20 La figura 8 ilustra la mayor sensibilidad de un ensayo de detección de PCR cuantitativa en tiempo real del gen hsp70 de la cepa bacteriana *Babesia canis* (BC) usando cebadores quiméricos de ARN/ADN (figura 8 A) en comparación con cebadores de ADN regulares (figura 8 B).

25 La figura 9 presenta el análisis de  $T_m$  (temperatura de fusión) usando cebadores de ADN (figura 9A) y cebadores quiméricos (figura 9B) del gen ACTB de *Canis*. La figura 9A demostró picos de productos no específicos en altas diluciones usando cebadores de ADN, mientras que en el caso de cebadores quiméricos; el único pico significativo fue el pico ACTB. Un pico significativo es un requisito previo para un análisis de HRM posterior a la PCR.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona métodos y kits útiles para reducir o eliminar productos de amplificación no específicos y otros artefactos generados durante las reacciones de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN *in vitro*. Los métodos utilizan cebadores de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN, y/o sondas oligonucleotídicas quiméricas de ARN/ADN. Son simples y de bajo coste, y son aplicables a cualquier método de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN.

### 35 Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación varios términos.

40 Como se usa en el presente documento, un "dímero de cebador" o "dímero de cebador-sonda" es un artefacto independiente de plantilla de doble cadena de una reacción de amplificación cuya longitud es típicamente cercana a la suma de las dos longitudes de cebador o la longitud del cebador y la sonda, menos la zona de superposición.

45 Los términos y expresiones "sonda", "sonda de baliza molecular", "sonda TaqMan" y "sonda doblemente marcada" indican una sonda de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico específico. En el caso de balizas moleculares, la sonda es una secuencia en forma de horquilla con un tramo central de nucleótidos complementarios a la secuencia diana y sus extremos que comprenden secuencias cortas mutuamente complementarias, un extremo unido covalentemente a un fluoróforo (colorante indicador) y el otro a un colorante de inactivación. En el estado nativo, los extremos se hibridan y el indicador y el colorante inactivador están lo suficientemente cerca como para que la fluorescencia del colorante indicador se inactive de manera eficaz mediante el colorante inactivador. La sonda hibridada, por el contrario, da como resultado una conformación linealizada en la que disminuye el grado de inactivación. En el caso de una sonda TaqMan o sonda doblemente marcada, la sonda no tiene necesariamente forma de horquilla, y la reacción debe contener una enzima de hidrólisis 5' -> 3' que hidroliza la base marcada 5' separando de este modo la sonda del inactivador. Por lo tanto, controlando los cambios de emisión para los colorantes de fluorescencia, es posible controlar indirectamente la formación del producto de amplificación (véase, por ejemplo, Tyagi, S. y Kramer, F. R., *Nature Biotechnology* 14:303-308 (1996); y Tyagi, S. et al., *Nat. Biotechnol.* 16: 49-53 (1998)). Por lo tanto, a medida que avanza la reacción, y la cantidad de productos amplificados aumenta, también aumenta la fluorescencia. Se representa un diagrama de amplificación que representa el cambio en la fluorescencia en función del número de ciclo, en el que se establece un umbral arbitrario, habitualmente a 10

desviaciones estándar por encima de la media de la emisión de línea de base calculada a partir de los ciclos iniciales. Una vez que se elige el umbral, el punto en el que la gráfica de amplificación cruza el umbral se define como el ciclo umbral (C(t)) o el punto de cruce (CP). El ciclo umbral es predictivo de la cantidad de la secuencia.

5 La expresión "colorante de unión a dsDNA" o "sonda no específica" indica un componente químico que no interactúa con el ADN monocatenario pero se intercala activamente con el ADN bicatenario y emite luz tras la excitación en este estado. Los ejemplos de colorantes fluorescentes incluyen, pero sin limitación, SYBR Green I, SYTO 9, LC Green, Eva Green, y otros.

10 Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un desoxirribonucleótido (que contiene 2-desoxi-D-ribosa) o un ribonucleótido (que contiene D-ribosa). El término "ribonucleótido" y la expresión "base de ARN", y el término "desoxirribonucleótido" y la expresión "base de ADN" se usan indistintamente.

El término "oligonucleótido" se define como una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos y/o  
15 ribonucleótidos, preferiblemente más de seis. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que, a su vez, dependen de la función y uso últimos del oligonucleótido.

El término "cebador" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de oligonucleótidos de un producto de extensión de cebador,  
20 complementario a una cadena de ácido nucleico, que sirve como plantilla. La extensión del cebador se inicia en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados.

El término "diana", y la expresión "secuencia diana", se refieren a una región o secuencia de un ácido nucleico que se va a amplificar. Las expresiones "amplificación no específica" y "amplificación independiente de plantilla" como se  
25 usan en el presente documento, se usan indistintamente y se refieren a la amplificación de secuencias de ácido nucleico distintas de la secuencia diana, que es resultado de cebadores que hibridan con secuencias distintas de la secuencia diana y que sirven entonces como sustrato para la extensión del cebador.

Las expresiones "quimera de ARN/ADN" y "oligonucleótido quimérico de ARN/ADN" se usan indistintamente y se  
30 definen como un oligonucleótido que comprende desoxirribonucleótidos y al menos un ribonucleótido, que puede funcionar como cebador o sonda en una reacción de amplificación de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "zona de iniciación" se refiere a la zona en la que tiene lugar el inicio de la síntesis de ADN de productos de elongación de cebadores. Incluye el punto donde la síntesis de ADN  
35 comienza y se extiende algunos nucleótidos en la dirección de la síntesis de ADN.

Las expresiones "aguas arriba" y "aguas abajo" se usan en el presente documento para definir la ubicación de un nucleótido en relación con otro nucleótido dentro de la secuencia de un oligonucleótido. Un nucleótido situado aguas  
40 arriba de otro nucleótido significa que el primer nucleótido está ubicado 5' con respecto al otro nucleótido. Un nucleótido situado aguas abajo de otro nucleótido significa que el primer nucleótido está ubicado 3' con respecto al otro nucleótido.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

45 Se ha descubierto que los productos de amplificación no específicos podrían reducirse, o incluso eliminarse, mediante el uso de cebadores de quimera de ARN/ADN. En los métodos descritos, dichos artefactos de amplificación no específicos contienen ARN en la zona de iniciación y están poco amplificados. La presencia de ribonucleótidos en ubicaciones seleccionadas en cebadores y sondas oligonucleotídicas aumenta la sensibilidad de los ensayos de PCR en tiempo real, debido a la reducción, o incluso a la eliminación, de productos de amplificación  
50 no específicos. El proceso de selección no es aleatorio y puede requerir un diseño cuidadoso para obtener resultados óptimos. En términos generales, las bases de ARN se pueden dispersar a lo largo del cebador desde el extremo 3' a la última base 5'. Dado que los dímeros de cebadores son el artefacto más prevalente, las bases candidatas más importantes para la incrustación de ARN se encuentran alrededor del centro del cebador. El extremo 5' del cebador es la base menos importante en la lista de modificaciones. En el diseño de la quimera, es preferible  
55 evitar cadenas de ARN que podrían bloquear la elongación del ADN.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción, parece que los productos de amplificación no específicos se generan principalmente cuando se produce emparejamiento de bases entre el extremo 3' de un cebador y una base complementaria en otro cebador o sonda, o incluso cuando el auto-emparejamiento se produce

entre el extremo 3' de un cebador y una base complementaria en el mismo cebador.

Por lo tanto, en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN, si un ribonucleótido está presente muy cerca de una base complementaria al extremo 3' de otro cebador o sonda o a su propio extremo 3', la elongación del dímero de cebadores o el dímero cebador-sonda se verá obstaculizada debido a la presencia del ribonucleótido en la zona de iniciación y la generación de productos de amplificación no específicos se reducirá o incluso se eliminará.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para reducir o eliminar productos de amplificación no específicos en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN que comprende realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando al menos un oligonucleótido quimérico de ARN/ADN como cebador directo o inverso y una ADN polimerasa dependiente de ADN para amplificar una secuencia diana, y opcionalmente una o más sondas oligonucleotídicas, en donde el oligonucleótido quimérico comprende al menos un ribonucleótido; y en donde el número de ribonucleótidos dentro de uno a 10 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido quimérico permitirá la iniciación de la síntesis de ADN y no evitará la elongación del ADN cuando el cebador forma un dúplex con la secuencia diana deseada e impedirá la iniciación de la síntesis de ADN a partir de dímeros de cebador-cebador o dímeros de cebador-sonda; y en donde no hay dos ribonucleótidos que estén adyacentes entre sí en el cebador.

Se obtiene una mejor eficacia en la reducción de productos de amplificación no específicos cuando el cebador directo y el cebador inverso son ambos quimeras de ARN/ADN. En algunas realizaciones, todos los cebadores y sondas usados en la reacción de amplificación tienen la misma base en el extremo 3'. Es deseable que todos los cebadores tengan el mismo extremo 3' para minimizar el número de bases que se van a modificar. En una realización preferida, el extremo 3' de todos los cebadores usados en la reacción de amplificación es A o T.

En algunas realizaciones, al menos un cebador o sonda quimérica comprende un ribonucleótido ubicado en o adyacente al menos a uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción.

En diversas realizaciones, cada cebador quimérico o sonda comprende al menos un ribonucleótido localizado en o dentro de uno a 5 nucleótidos de al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o el extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción. En realizaciones preferidas, cada cebador quimérico o sonda comprende un ribonucleótido situado en o adyacente a al menos uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción.

Se pueden usar numerosas configuraciones, en términos de la colocación de las bases de ARN, en la quimera de ARN/ADN descrita en la presente invención, que varía de la modificación de uno cualquiera de los nucleótidos complementarios a su propio cebador o al otro cebador o cebadores del extremo 3', o la modificación de su vecino o vecinos, a la modificación de todos estos nucleótidos, siempre que no se produzcan fragmentos de ARN en el oligonucleótido modificado. Sin embargo, no es necesario modificar todos los nucleótidos complementarios al extremo 3' de sí mismo y otro cebador o cebadores o el vecino o vecinos de todos estos nucleótidos, ya que pueden producirse regiones llenas de ARN y bloquear la elongación.

Las bases de ARN se pueden dispersar a lo largo del cebador desde el extremo 3' a la última base 5'. Dado que los dímeros de cebadores son el artefacto más prevalente, las bases más importantes para modificar se ubican en el centro del cebador. El extremo 5' del cebador es la base menos importante en la lista de modificaciones. En el diseño de la quimera, es preferible evitar cadenas de ARN que podrían bloquear la elongación del ADN.

El diseño y uso de cebadores de amplificación en general es bien conocido en la técnica. Los cebadores de la presente invención se distinguen por la inclusión de bases de ARN en la secuencia de cebador. Otros aspectos del cebador, tales como la longitud total y la secuencia, se seleccionan siguiendo la práctica estándar del diseño de cebadores. Un experto en la técnica reconocerá que con un diseño cuidadoso, la secuencia óptima de un cebador o sonda de quimera de ARN/ADN para una aplicación específica requerirá una mínima experimentación.

El método descrito se puede usar con cualquier reacción de amplificación de ácido nucleico, para reacciones singleplex y multiplex y para ensayos que requieren una reacción de amplificación de ácido nucleico como una etapa anterior, tal como análisis de HRM. Las formas de amplificación de ácidos nucleicos para el uso de la quimera de ARN/ADN descrita incluyen reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que implican amplificación exponencial, ya sea isotérmica o con ciclos térmicos, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que requieren amplificación

- exponencial, ya sea isotérmica o con ciclos térmicos, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que implican amplificación lineal isotérmica, reacciones de amplificación de ácido nucleico que requieren amplificación lineal isotérmica, reacciones de amplificación de ácido nucleico que implican amplificación de círculo rodante, reacciones de amplificación de ácido nucleico que implican reacción en cadena de la polimerasa, y reacciones de amplificación de ácido nucleico que no implican ciclo térmico. Los ejemplos de reacciones de amplificación de ácido nucleico son amplificación de círculo rodante exponencial (ERCA) (denominada amplificación en cascada de desplazamiento de cadena en la solicitud PCT N.º WO 97/19193 y como amplificación de círculo rodante hiperramificado en Lizardi et al., *Nature Genetics* 19(3):225 232 (1998)) y amplificación de círculo rodante (RCA) (Pat. de Estados Unidos N.º 5.854.033; Solicitud PCT N.º WO 97/19193; Lizardi et al., *Nature Genetics* 19(3): 225 232 (1998)); amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) (Solicitud PCT WO 99/18241); amplificación por desplazamiento en cadena (SDA) (Walker et al., *Nucleic Acids Research* 20: 1691 1696 (1992), Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392 396 (1992)); amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, *Nature* 350:91 92 (1991)); amplificación mediada por transcripción (TMA) (Nelson, *Crit Rev Clin Lab Sci* 35: 369 414 (1998)); reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, y otras técnicas de amplificación exponencial que implican ciclos térmicos, replicación de secuencia autosostenida (3SR) y amplificación con Q $\beta$  replicasa (Birkenmeyer y Mushahwar, *J. Virological Methods* 35: 117 126 (1991); Landegren, *Trends Genetics* 9: 199 202 (1993)); diversas técnicas de amplificación lineal que implican ciclos térmicos tales como secuenciación cíclica (Craxton et al., *Methods Companion Methods in Enzymology* 3: 20 26 (1991)).
- 20 Las formas preferidas de ensayos de amplificación de ácido nucleico para el uso de la quimera de ARN/ADN descrita incluyen ensayos de "PCR en tiempo real", también denominados en el presente documento "PCR cuantitativa (qPCR)" y análisis de "fusión de alta resolución (HRM)". En los métodos de qPCR, el progreso de la reacción de PCR se controla a medida que se produce (es decir, en tiempo real). En dichos métodos, se usan tintes fluorescentes que se unen a dsDNA (tales como SYBR Green I), o sondas doblemente marcadas (tales como balizas moleculares o sondas Taqman) para medir la cantidad de producto amplificado en tiempo real. La diferencia más importante entre la sonda doblemente marcada y los colorantes fluorescentes no específicos es que el colorante fluorescente no específico detecta todo el ADN bicatenario, incluyendo los productos de amplificación no específicos. Por otro lado, los métodos de sonda doblemente marcada tienen la desventaja de requerir la síntesis de diferentes sondas para diferentes secuencias, lo que aumenta la configuración del ensayo y los costes de realización. Además, las sondas específicas no permiten el análisis posterior a la PCR, tal como T<sub>m</sub> (punto de fusión) y HRM, que es posible con tintes no específicos.

En ensayos de fusión de alta resolución (HRM), un método de post-PCR de tubo cerrado permite el análisis de variaciones genéticas (SNP, mutaciones, metilaciones) en amplicones de PCR. Va más allá del poder del análisis clásico de la curva de fusión al permitir el estudio de la desnaturalización térmica de un ADN bicatenario con mucho más detalle y con un rendimiento de la información mucho más alto que nunca. La HRM caracteriza las muestras de ácido nucleico en función de su comportamiento de disociación (fusión). Las muestras se pueden discriminar de acuerdo con su secuencia, longitud, contenido de GC o complementariedad de cadena. Incluso se pueden identificar fácilmente cambios únicos de base, tales como los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido).

La aplicación de fusión de alta resolución más importante es la exploración génica, la búsqueda de la presencia de variaciones desconocidas en amplicones de PCR antes de, o como una alternativa a la secuenciación. Las mutaciones en productos de PCR son detectables mediante fusión de alta resolución porque cambian la forma de las curvas de fusión del ADN. Una combinación de tintes de ADN de nueva generación, instrumentación de alta gama y sofisticado software de análisis permite detectar estos cambios y obtener información sobre la constelación de secuencias subyacente.

### **Kits**

50 La presente invención también proporciona kits, típicamente unidades de múltiples contenedores que comprenden componentes útiles para poner en práctica el presente método. El kit contiene un cebador o un conjunto de cebadores al menos uno de los cuales es una quimera de ARN/ADN como se describe en el presente documento. Otros componentes del kit incluyen los reactivos y las enzimas necesarias para realizar la reacción de amplificación, por ejemplo, los trifosfatos de nucleósido de sustrato, cationes divalentes, tampón de reacción, ADN polimerasa  
55 apropiada, protocolos, e instrucciones para realizar la reacción.

Los kits se pueden usar para cualquier aplicación que implique una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, tales como kits de diagnóstico para agentes infecciosos, kits para diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas, kits para el diagnóstico de enfermedades genéticas, kits para determinar el sexo, etc.

En algunas realizaciones, el kit comprende además los medios para detectar los productos de la reacción de amplificación. Está disponible una diversidad de opciones para medir los productos de amplificación a medida que se forman. Un método utiliza etiquetas, tales como tintes, que solo se unen al ADN bicatenario. En este tipo de enfoque, el producto de amplificación (que es bicatenario) se une a moléculas de colorante en solución para formar un complejo. Con los tintes apropiados, es posible distinguir entre las moléculas de colorante libres en solución y las moléculas de colorante unidas al producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos colorantes fluorescentes solamente cuando se unen al producto de amplificación. Los ejemplos de colorantes que se pueden usar en métodos de este tipo general incluyen, pero sin limitación, Syber Green™ y Pico Green™ de Molecular Probes, Inc., LCGreen de Idaho technology., bromuro de etidio, yoduro de propidio, cromomicina, naranja acridina, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (clorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol).

Además, la medición y detección de productos de amplificación también pueden realizarse, por ejemplo, controlando la radiactividad, la colorimetría, la absorción, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), los parámetros magnéticos, o la actividad enzimática. Por lo tanto, las etiquetas para los cebadores y/o sondas, que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, fluoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos densos de electrones, enzimas y ligandos que tienen compañeros de unión específicos (por ejemplo, biotina-avidina).

#### Síntesis de cebadores quiméricos de ARN/ADN

La síntesis de los cebadores quiméricos de ARN/ADN se realiza usando medios químicos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; y el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N.º 4.458.066. Preferiblemente, la reacción de síntesis se realiza en un sintetizador de ADN automático disponible en el mercado usando fosforamiditas de nucleótidos disponibles en la técnica. Las fosforamiditas y los soportes de nucleótidos adecuados para sintetizar oligonucleótidos que contienen nucleótidos modificados como se usan en el presente documento están disponibles en el mercado. La síntesis de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN se realiza mediante la adición por etapas de monómeros de desoxinucleósidos y ribonucleósidos a una cadena en crecimiento. Cada adición implica el acoplamiento de un grupo reactivo 3' fósforo de un monómero nucleosídico al 5' hidroxilo de otro nucleósido unido a un soporte sólido. Después de la adición del nucleósido final, el oligonucleótido se escinde del soporte, los grupos protectores se eliminan de las bases, y el oligonucleótido quimérico de ARN/ADN se purifica para su uso.

#### Eficiencia

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la eficacia de la *iniciación* de la síntesis de ADN en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN se ve obstaculizada cuando el ARN está incrustado en la zona de iniciación, mientras que la eficacia de la *elongación* del ADN se ve menos afectada cuando el ARN está incrustado en la secuencia plantilla.

Sin embargo, cuando se produce una hibridación sin plantilla no deseable, tal como un dímero de cebador de quimera de ARN/ADN, la zona de iniciación incluye bases de ARN. De nuevo, sin desear quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo en particular, se supone que esto hace que los ciclos de amplificación sean cinética y/o termodinámicamente ineficaces. La incorporación de bases de ARN en cebadores de ADN probablemente desestabiliza el apareamiento de bases. Sin embargo, la desestabilización de los dímeros de cebadores es probablemente más profunda que la desestabilización del híbrido de ADN cebador-diana. Nakano et al. investigaron la termodinámica de las uniones quiméricas con el ADN y demostraron que el vecino más cercano  $\Delta G_{37}^{\circ}$  de las uniones quiméricas (rd/dd y dr/dd) era diferente de los híbridos de ADN (dd/dd) (Nakano et al. (2004) J Am Chem Soc, 126, 1088-1095). No siempre se aumentó, pero se produjo con más frecuencia.

Por lo tanto, el uso de cebadores quiméricos de ARN/ADN reduce los artefactos de dímero de cebadores en reacciones de amplificación de ADN de plantilla bajas dando como resultado una sensibilidad de detección aumentada en cualquier reacción de polimerización de ADN dependiente de ADN.

Esto se ilustra con más detalle en el siguiente ejemplo, usando una secuencia diana hipotética. Con referencia a la figura 1, la secuencia expuesta en la diana de plantilla SEQ ID NO: 1 debe amplificarse con cebadores de quimera de ARN/ADN (cebador directo: SEQ ID NO:2; cebador inverso: SEQ ID NO:3). En el primer ciclo de amplificación, la iniciación y la síntesis de la longitud completa del amplicón implica utilizar únicamente bases de ADN como plantilla.

Con referencia ahora a la figura 2 y la figura 3, se puede ver que después de la fusión y la hibridación, el segundo y

el tercer ciclo de amplificación son menos eficaces ya que los cebadores incrustados con ARN son ahora parte de la zona de elongación, pero factibles. En la amplificación dependiente de la plantilla, las bases de ARN siempre se localizan solamente en la zona de elongación.

- 5 Por otro lado, cuando se produce una hibridación sin plantilla no deseada, tal como en el dímero de cebador de quimera de ARN/ADN en la figura 4, la zona de iniciación incluye bases de ARN. Esto hará que el primer ciclo de amplificación y todos los ciclos siguientes sean ineficientes. Por lo tanto, el uso de cebadores de quimera de ARN/ADN reduce los artefactos de dímero de cebadores en reacciones de amplificación de ADN de plantilla bajas y da como resultado una sensibilidad de detección aumentada en cualquier reacción de polimerización de ADN dependiente de ADN.

La presente invención presenta evidencia de los efectos beneficiosos de cebadores de quimera de ARN/ADN sobre la reducción de productos de amplificación no específicos no deseados en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN. Los hallazgos indican que los cebadores de quimera de ARN/ADN eliminaron los productos de amplificación no específicos y aumentaron la sensibilidad y la capacidad de detección de bajas concentraciones de copias de genes en ensayos de PCR en tiempo real.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que están destinados a ser interpretados de una manera no limitativa.

20

## Ejemplos

### Métodos

25 Los oligonucleótidos estándares y oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN se sintetizaron por Integrated DNA Technologies, Inc. (Estados Unidos), usando química estándar de fosforamiditas usando la plataforma de síntesis patentada de IDT. El diseño del cebador para el ensayo de qPCR de oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN se realizó mediante el software SinglePlexer™ (GenAphora Ltd). Se incrustaron varias bases de ARN individuales en cada cebador. Las reacciones de veinte  $\mu$ l incluían 0,5  $\mu$ M de cada cebador,  $10^4$  ADN plasmídico y 10  $\mu$ l del kit de qPCR DyNAmo™ Flash SYBR® Green (Finnzymes Oy). Los ciclos de amplificación fueron: 95 °C, 7 min (primer ciclo); 94 °C, 10 s; 61 °C, 30 s; placa de lectura; 76 °C, 1 s; placa de lectura; durante 39 ciclos; seguido de 61 °C, 1 min; y análisis de temperatura de fusión de 65 °C-95 °C. Los ensayos se realizaron utilizando el gen de ARN 16s de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) y el gen hsp70 de la cepa bacteriana *Babesia canis* (BC) y la actina Canis preclonada en pGMT easy (Promega). La qPCR en tiempo real se realizó con muestras duplicadas en diferentes diluciones de  $\sim 1$  a  $\sim 10^6$  copias/ $\mu$ l usando Chromo4 (Bio Rad). Los valores de  $\Delta C(t)$  se calcularon como la diferencia entre el  $C(t)$  de la muestra y el  $C(t)$  del control sin plantilla.

30

35

### Ejemplo 1

40 Se realizó la PCR en tiempo real en  $10^4$  copias del gen de ARN 16S de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) con cebadores de ADN y con cebadores quiméricos de ARN/ADN.

### Cebadores de ADN:

45 Cebador directo: 5'-TCGCTATTAGATGAGCCTACGT-3' (SEQ ID NO:4)  
Cebador inverso: 5'-GAGTCTGGACCGTATCTCAGTT-3' (SEQ ID NO:5)

### Cebadores quiméricos de ARN/ADN

50 (las bases de ARN incrustadas están en negrita):

Cebador directo: 5'-TCGCUATUAGATGAGCCUACGT-3' (SEQ ID NO:6)  
Cebador inverso: 5'-GAGTCTGGACCGUATCTCAGTT-3' (SEQ ID NO:7)

55 Los resultados se presentan en la figura 5. Como se puede ver, pueden detectarse artefactos significativos en ausencia de plantilla (véase curva de control sin plantilla (NTC)) después del ciclo 27 cuando se usan cebadores de ADN, pero permanecen por debajo del umbral de detección cuando se usan cebadores quiméricos. De hecho, los valores de  $C(t)$  de los productos dependientes de plantilla específicos se retrasan durante aproximadamente 3 ciclos, pero la eliminación de productos no específicos permite la prolongación de la detección durante al menos 13 ciclos

más que la reacción de cebadores de ADN regular.

Este efecto de los cebadores quiméricos de ARN/ADN se demuestra adicionalmente en la figura 6 que muestra los valores calculados de  $\Delta C(t)$  de muestras hexaplicadas. Se puede ver que la capacidad de detección de los 5 cebadores quiméricos es más de 4 ciclos mayor que los cebadores de ADN regulares.

Ejemplo 2

La PCR en tiempo real se realizó en diluciones seriadas del gen de ARN 16S de la cepa bacteriana *Ehrlichia canis* (EC) con el mismo ADN y cebadores quiméricos del ejemplo 1. Los resultados se presentan en la figura 7A y 7B. Otra PCR en tiempo real, cuyos resultados se presentan en la figura 8A y 8B, se realizó en diluciones seriadas del gen hsp70 de la cepa bacteriana *Babesia canis* (BC) con los siguientes cebadores.

Cebadores de ADN:

15

Cebador directo: 5'-GTCATCACTGTGCCTGCGTACT-3' (SEQ ID NO:8)  
 Cebador inverso: 5'-GCATGACGTTGAGACCGGCAAT-3' (SEQ ID NO:9)

Cebadores quiméricos de ARN/ADN:

20

(las bases de ARN incrustadas están en negrita):

Cebador directo: 5'-GTCATCACTGTGCCTGCG**U**ACT-3' (SEQ ID NO:10)  
 Cebador inverso: 5'-GCATGACGTTGAGACCGGCAAT-3' (SEQ ID NO:11)

25

Este ejemplo demuestra que la sensibilidad de la reacción de amplificación aumenta al usar cebadores quiméricos de ARN/ADN. En ambos casos, el uso de cebadores quiméricos permite la detección de bajas concentraciones de copias de genes hasta unas pocas copias por tubo.

30 Ejemplo 3

En este ejemplo, se realizó un análisis de Tm después de la qPCR que se realizó con ADN y cebadores quiméricos en diluciones seriadas del gen canino ACTB.

35 Cebadores de ADN:

Cebador directo: 5'-GCGCAAGTACTCTGTGTGGAT-3' (SEQ ID NO:12)  
 Cebador inverso: 5'-GTCGTA**C**CTGCTTGCTGAT-3' (SEQ ID NO:13)

40 Cebadores quiméricos de ARN/ADN:

(las bases de ARN incrustadas están en negrita):

Cebador directo: 5'-GCGCAAG**U**ACTCTGTGTGGAT-3' (SEQ ID NO:14)  
 Cebador inverso: 5'-GTCG**U**ACTCCTGCTTGCTGAT-3' (SEQ ID NO:15)

45

Este ejemplo demuestra el aumento de especificidad que se obtiene usando cebadores quiméricos para PCR que precede al análisis de HRM en bajas concentraciones de plantilla. Cuando se usan cebadores de ADN (figura 9A) se pueden ver picos de productos no específicos en el gráfico de Tm en el intervalo de 70 °C a 78 °C, mientras que los picos de Tm de los amplicones esperados en alta concentración de plantilla varían de 81 °C a 82 °C. La figura 9B muestra el gráfico de Tm obtenido al usar cebadores quiméricos de ADN/ARN. Aquí, se puede observar solamente los picos esperados tanto a bajas como a altas concentraciones. El gráfico de Tm obtenido mediante el uso de cebadores quiméricos de ADN/ARN permite también el análisis posterior de HRM por PCR en bajas concentraciones.

55

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Rychlik, W. (1995) Mol. Biotechnol. 3, 129-134  
 2. Watson, R. (1989) Amplifications, 5-6

3. Ferrie, R. M., Schwarz, M. J., Robertson, N. H., Vaudin, S., Super, M., Malone, G. and Little, S. (1992) Am. J. Hum. Genet. 51, 251-262
4. Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. and Mattick, J. S. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4008
5. Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. and Bloch, W. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 1717-1723
6. D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J. A., Eron, J. J., Goccyca, P. and Kaplan, J. C. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3749
7. TaqMan PCR Reagent Kit Protocol: Part Number 402823, Revision A, May 1996 page 18: P. E. Applied Biosystems
8. Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996) Nature Biotechnology 14:303-308
9. Tyagi, S. et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16:49-53
10. Lizardi et al. (1998) Nature Genetics 19(3):225-232
11. Walker et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:1691-1696
12. Walker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392- 396
13. Compton (1991) Nature 350:91-92
14. Nelson (1998) Crit Rev Clin Lab Sci 35:369-414
15. Birkenmeyer and Mushahwar (1991) J. Virological Methods 35:117-126
16. Landegren (1993) Trends Genetics 9:199-202
17. Craxton et al. (1991) Methods Companion Methods in Enzymology 3:20-26
18. Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859-1862
19. Nakano, S., Kanzaki, T. and Sugimoto, N. (2004) J Am. Chem. Soc. 126, 1088-1095

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Genaphora Ltd.
- 25 <120> CEBADORES QUIMÉRICOS PARA REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEJORADAS
- <130> ZTAL/001 PCT
- 30 <140> US 60/947.685  
<141> 03-07-2007
- <160> 15
- 35 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 57  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Secuencia de ADN
- 45 <400> 1  
gcataactaag ctgagcgaca ttggccgtag ccatgcatgt attgctgcta gctgact 57
- <210> 2  
50 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
55 <223> Cebador PCR
- <400> 2  
gcataactaag ctgagcga 18

	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
10	<400> 3	
	agtcagctag cagcaata	18
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
20	<400> 4	
	tcgctattag atgagcctac gt	22
	<210> 5	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
30	<400> 5	
	gagtctggac cgtatctcag tt	22
	<210> 6	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador PCR	
	<400> 6	
	tcgcuatuag atgagccuac gt	22
45	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 7	
55	gagtctggac cguatctcag tt	22
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> Cebador PCR  
 5 <400> 8  
 gtcactactg tgctgcgta ct 22  
 <210> 9  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 15 <400> 9  
 gcatgacgtt gagaccgga at 22  
 <210> 10  
 <211> 22  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 25 <400> 10  
 gtcactactg tgctgcgua ct 22  
 <210> 11  
 <211> 22  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 35 <400> 11  
 gcatgacgtt gagaccgga at 22  
 <210> 12  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 45 <400> 12  
 gcgcaagtac tctgtgga t 21  
 <210> 13  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR

# ES 2 647 237 T3

	<400> 13 gtcgtactcc tgcttgctga t	21
5	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador PCR	
	<400> 14 gcgcaaguac tctgtgtgga t	21
15	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador PCR	
25	<400> 15 gtcguactcc tgcttgctga t	21

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para reducir o eliminar la formación de artefactos y productos de amplificación no específicos en una reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN, comprendiendo el método:
- 5 realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando al menos un oligonucleótido quimérico de ARN/ADN como cebador directo o inverso o como una sonda y usando una ADN polimerasa dependiente de ADN;
- 10 en el que el oligonucleótido quimérico comprende al menos un ribonucleótido que no está localizado en, pero está localizado dentro de diez nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido quimérico;
- en el que el al menos un ribonucleótido impide la síntesis de ADN a partir de dímeros de cebador-cebador o dímeros de cebador-sonda; y
- en el que no hay dos ribonucleótidos en el oligonucleótido quimérico que estén adyacentes entre sí.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el cebador directo y el cebador inverso son ambos oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN.
3. El método de la reivindicación 1, en el que todos los cebadores y sondas que se usan en la reacción de amplificación tienen una base idéntica a la base 3' terminal.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la base 3' terminal idéntica de los oligonucleótidos quiméricos se selecciona de A o T.
5. El método de la reivindicación 1 que comprende al menos dos oligonucleótidos quiméricos, en el que
- 25 dicho al menos un ribonucleótido en cada oligonucleótido quimérico es adyacente al menos a uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en la mezcla de reacción.
6. El método de las reivindicaciones 1-5, en el que la reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN se selecciona del grupo que consiste en amplificación de círculo rodante exponencial (ERCA),
- 30 amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación con Q $\beta$  replicasa y secuenciación cíclica.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que la reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN es una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).
8. Un kit para realizar una amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN que comprende:
- 40 (i) al menos un oligonucleótido quimérico de ARN/ADN como cebador directo o inverso o como sonda;
- en el que el oligonucleótido quimérico comprende al menos un ribonucleótido que no está localizado en, pero está localizado dentro de diez nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido quimérico;
- en el que el al menos un ribonucleótido impide la síntesis de ADN a partir de dímeros de cebador-cebador o dímeros de cebador-sonda; y
- 45 en el que no hay dos ribonucleótidos en el oligonucleótido quimérico que estén adyacentes entre sí,
- (ii) una ADN polimerasa dependiente de ADN;
- (iii) los reactivos y tampones necesarios para realizar la reacción de amplificación.
9. El kit de la reivindicación 8,
- 50 en el que el cebador directo y el cebador inverso son ambos oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN; o
- en el que todos los cebadores y las sondas del kit tienen una base idéntica a la base 3' terminal, preferiblemente en el que la base 3' terminal idéntica de los oligonucleótidos quiméricos se selecciona de A o T; o
- en el que cada oligonucleótido quimérico comprende un ribonucleótido situado adyacente al menos a uno de los nucleótidos que es complementario a su propio extremo 3' o al extremo 3' de otro cebador o sonda en el kit.
- 55 o cebador o sonda en el kit.
10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que la reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN se selecciona del grupo que consiste en amplificación de círculo rodante exponencial (ERCA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA),

amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación con Q $\beta$  replicasa y secuenciación cíclica.

5

11. El kit de la reivindicación 10, en el que la reacción de amplificación de ADN polimerasa dependiente de ADN es una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

12. El kit de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además los medios para detectar los  
10 productos de la reacción de amplificación.

TEMPLATE (SEQ ID NO:1):  
 5'-GCATAAGCTGAGCGACATTGGCCGTAGCCATGTCATGTTGGCTGCTAGCTGACT-3'  
 FORWARD PRIMER (SEQ ID NO:2): 5'-GCATAAGCTGAGCGGA-3'  
 REVERSE PRIMER (SEQ ID NO:3): 5'-AGTCAGCTAGCAGCAATA-3'

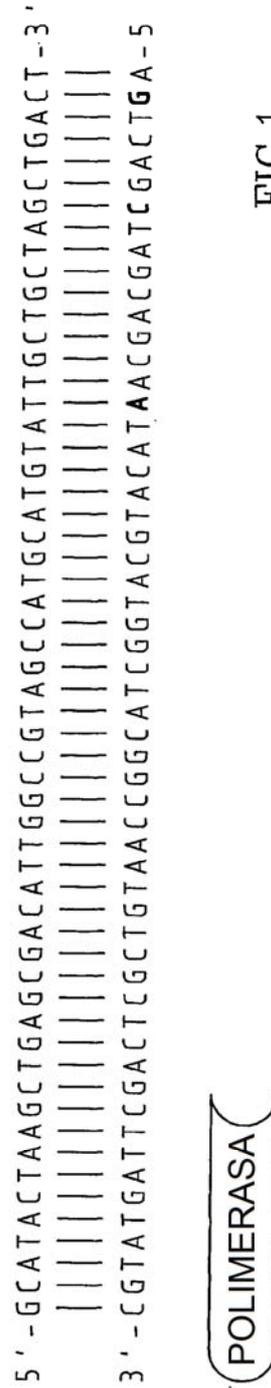
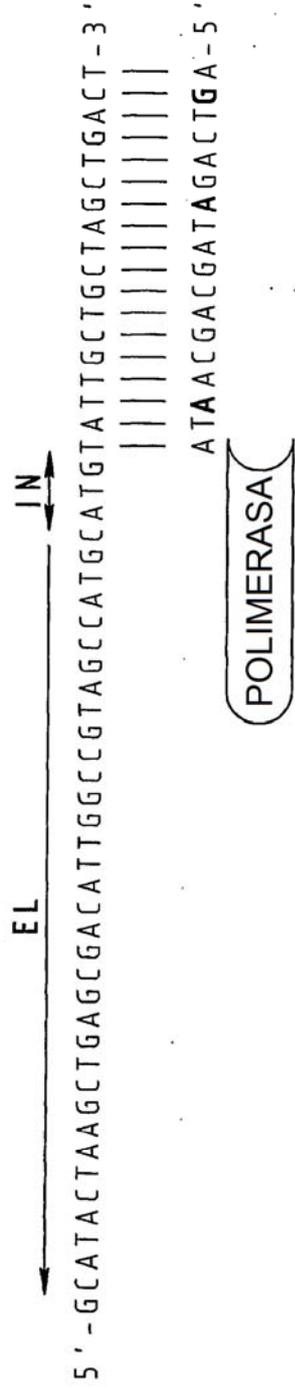


FIG.1

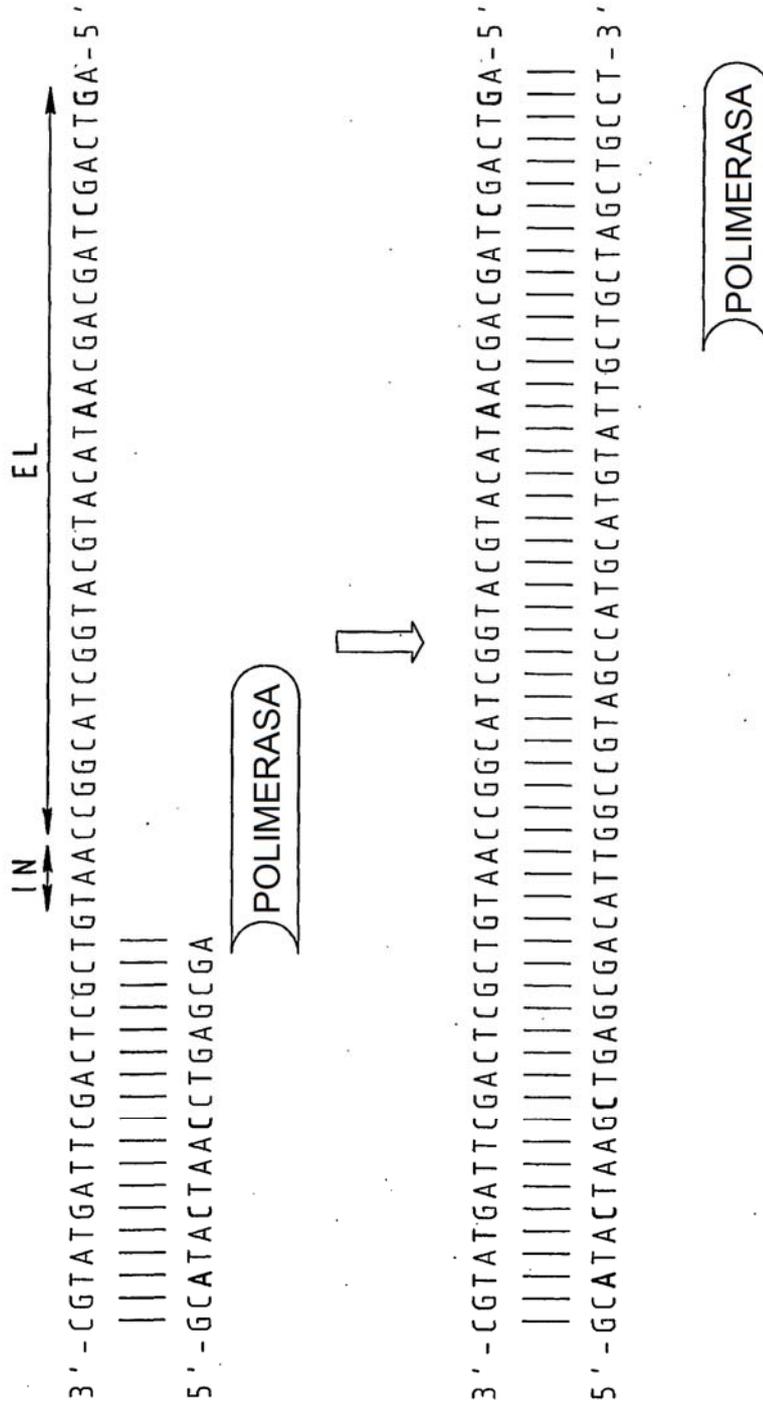


FIG.2

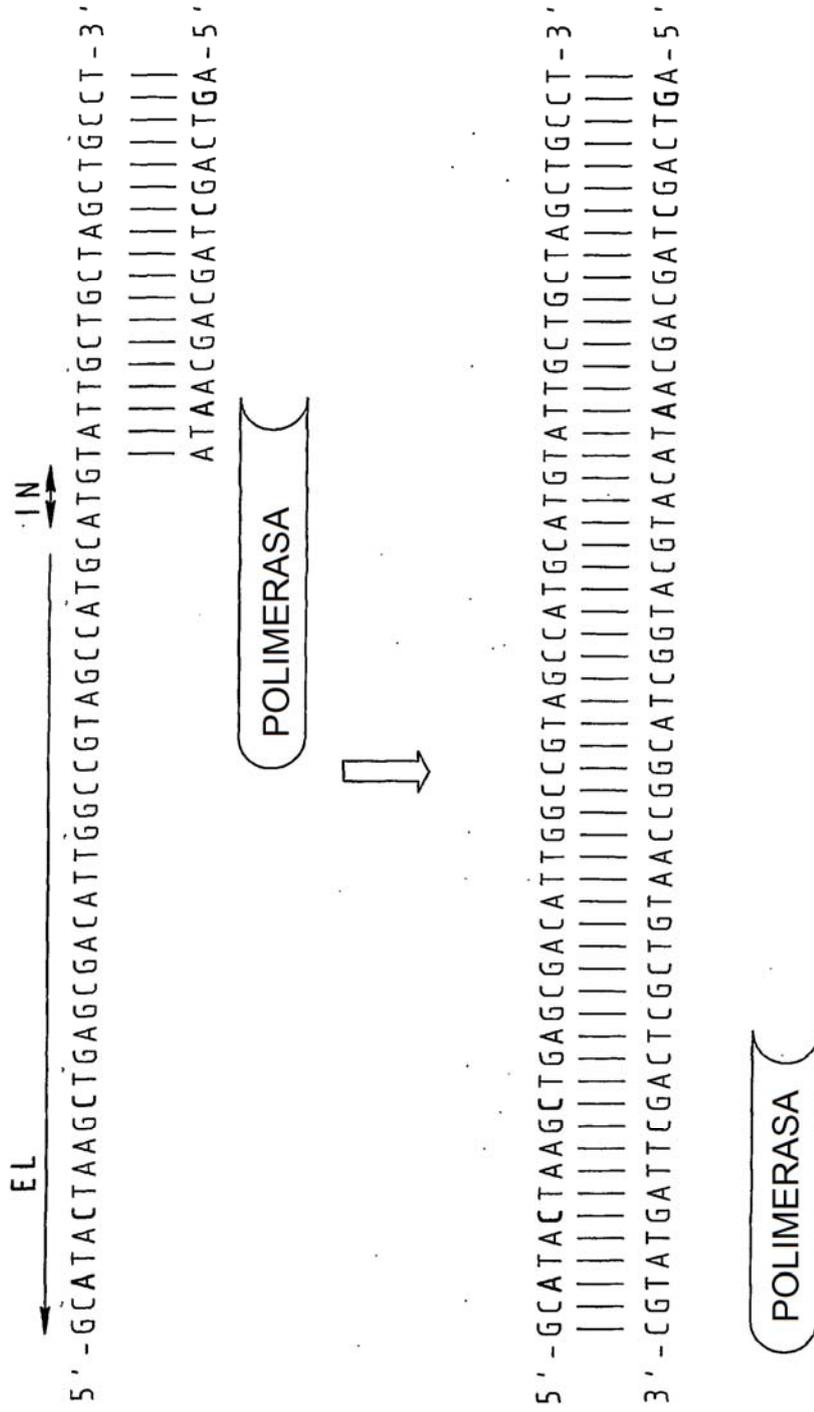


FIG.3

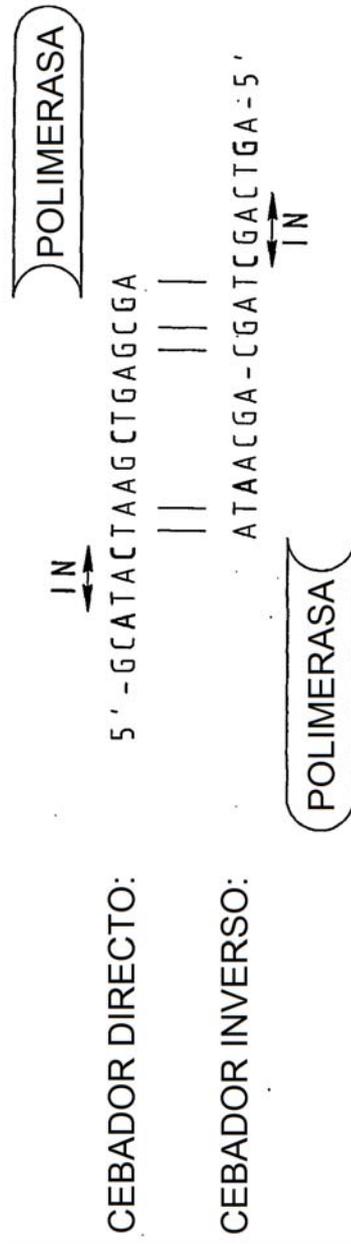


FIG.4

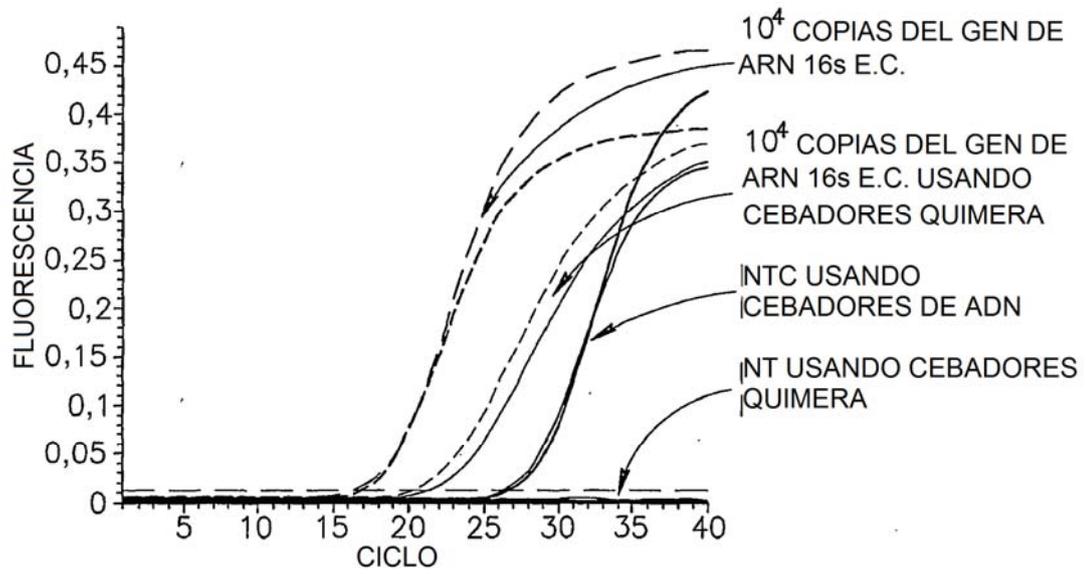


FIG.5

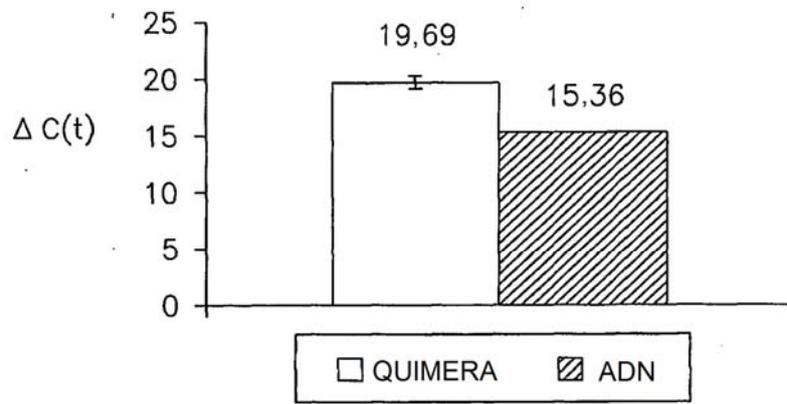


FIG.6

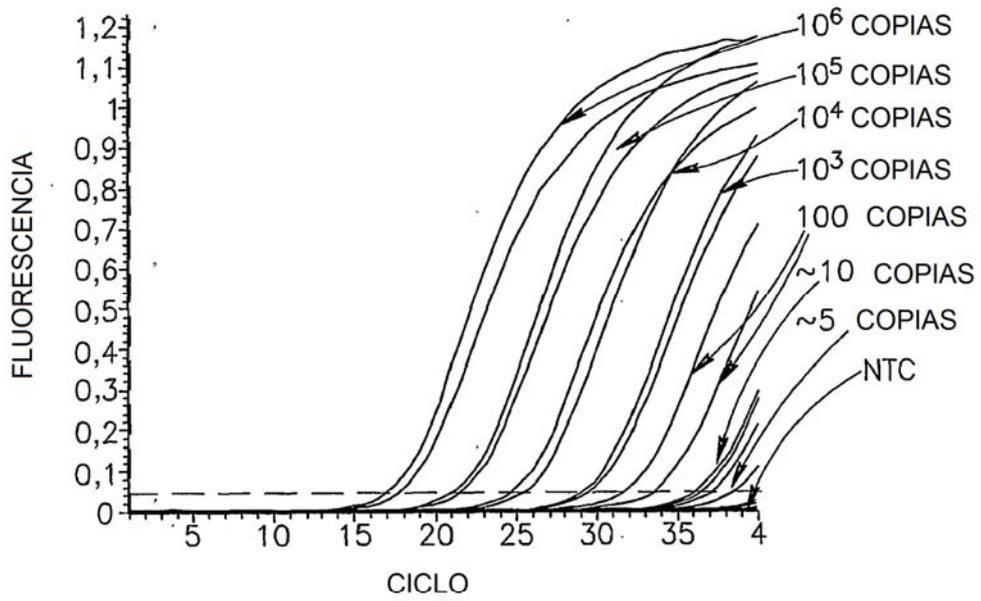


FIG.7A

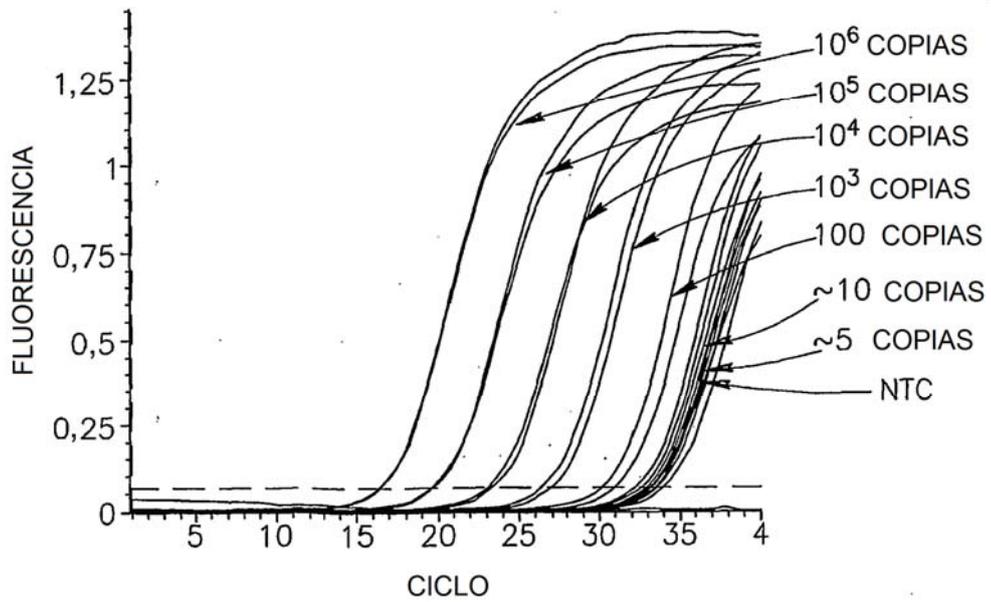


FIG.7B

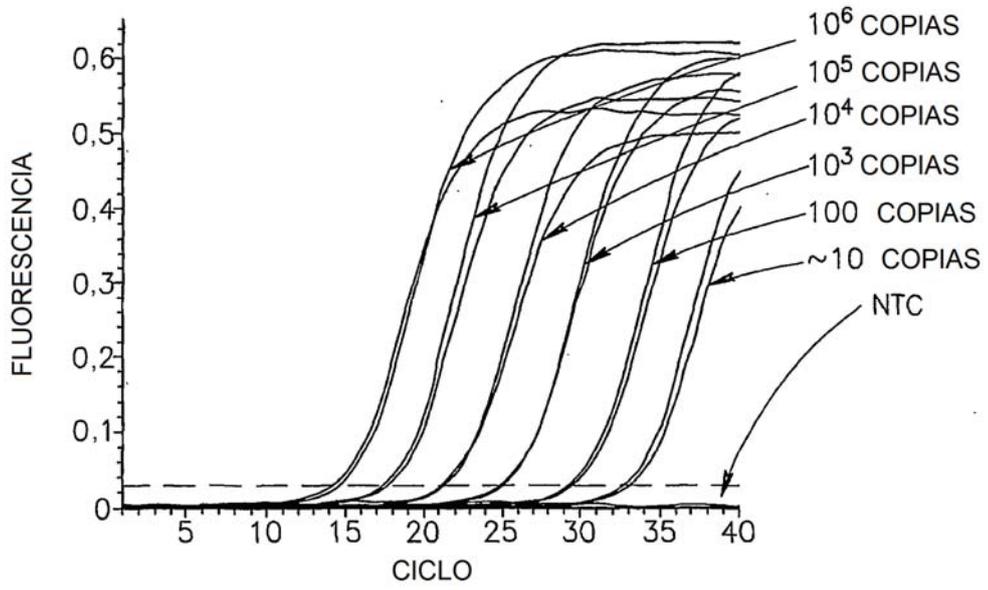


FIG.8A

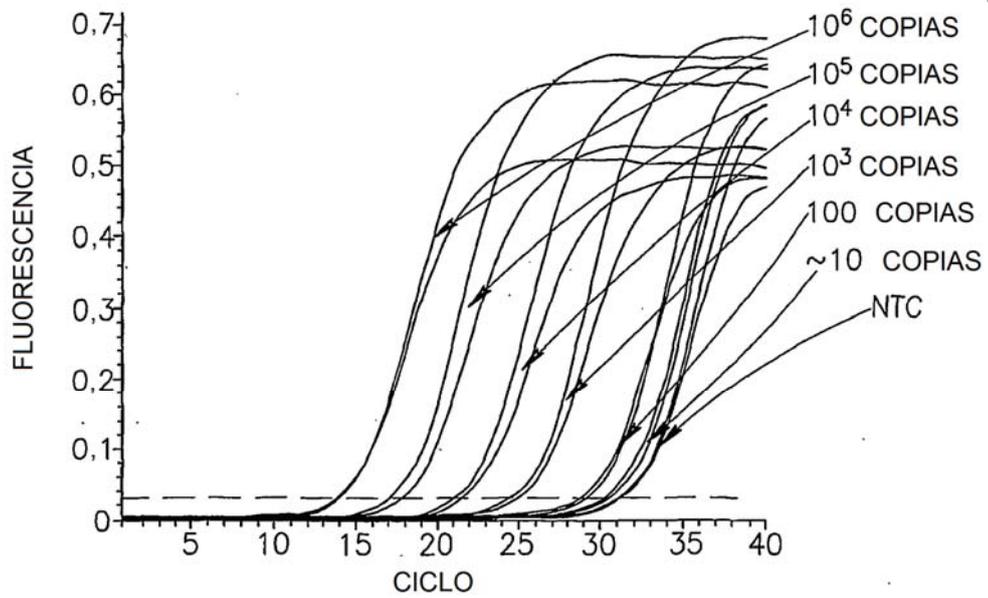


FIG.8B

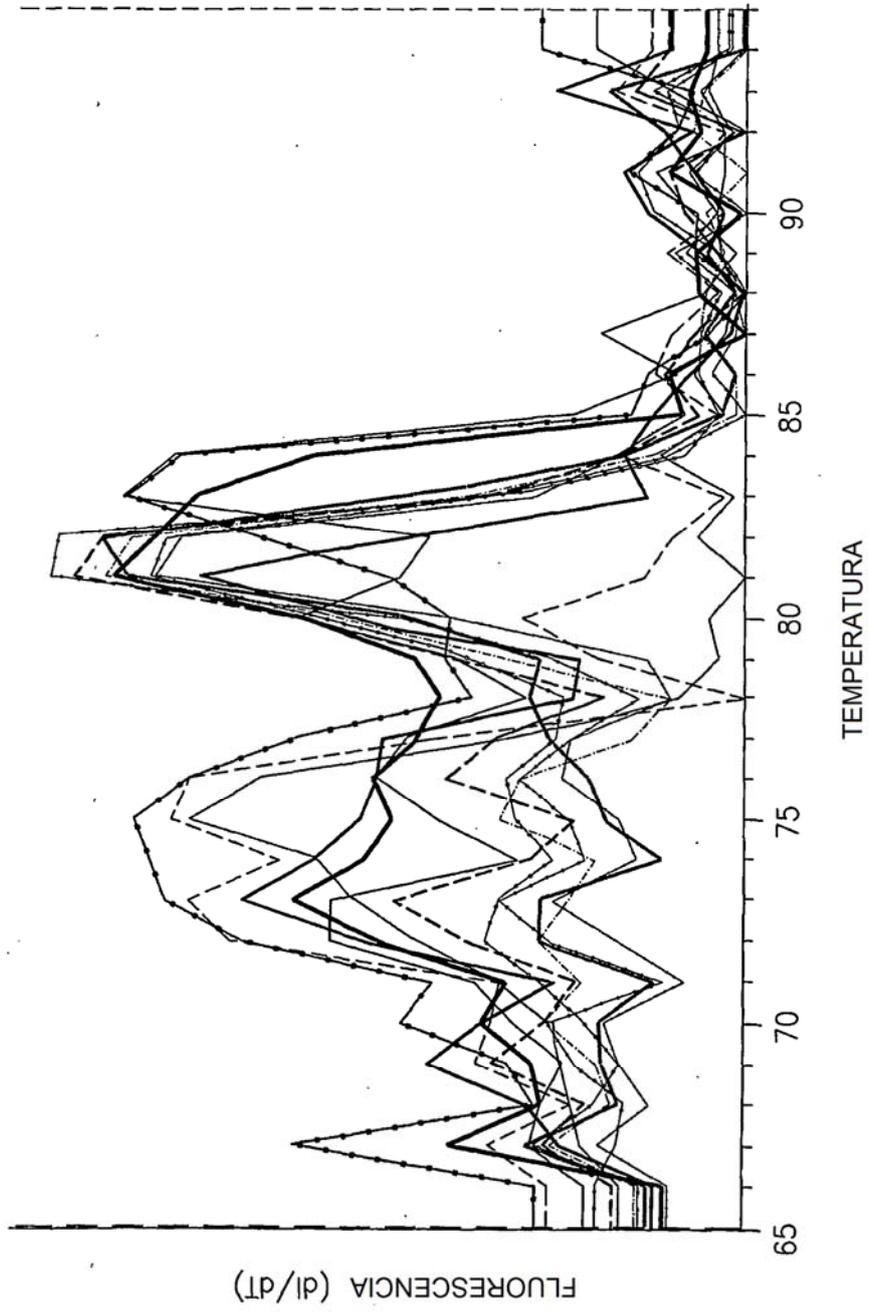


FIG.9A

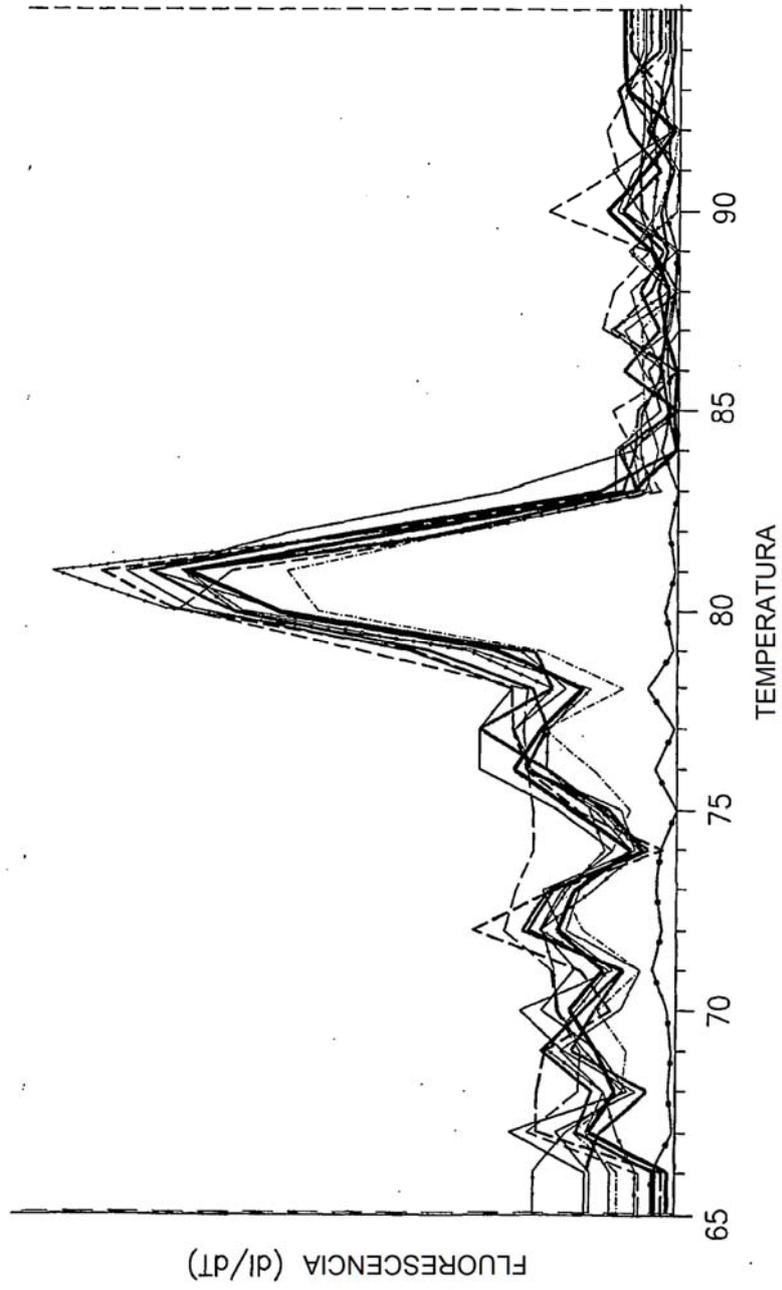


FIG.9B