



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0516619-5 B1

(22) Data do Depósito: 17/10/2005

(45) Data de Concessão: 10/02/2016
(RPI 2353)



(54) Título: REAGENTES, KIT DE REAGENTES E CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA REALIZAÇÃO DE UMA AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/04

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2004 US 60/619,670

(73) Titular(es): BRANDEIS UNIVERSITY

(72) Inventor(es): LAWRENCE J. WANGH, JOHN RICE, AQUILES J. SANCHEZ, KENNETH PIERCE, JESSE SALK, ARTHUR REIS

**REAGENTES, KIT DE REAGENTES E CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS
PARA REALIZAÇÃO DE UMA AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE**

CAMPO TÉCNICO

[001] A invenção se refere à reações de amplificação de ácido nucléico e ensaios utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR), incluindo ensaios homogêneos, em tempo real e ponto de término (*end-point*).

ANTECEDENTES

[002] A amplificação de ácido nucléico empregando reação em cadeia de polimerase (PCR) é bem conhecida, assim como ensaios que incluem amplificação por PCR. Veja Patentes U.S. 4.683.202, 4.683.195 e 4.965.188 e, de modo geral, PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis e colaboradores eds., Academic Press (San Diego, CA (EUA) 1990). Ensaios de PCR homogêneos que não requerem lavagem para remover os reagentes de detecção não ligados ou sondas e, assim, podem ser realizados sem vasos de reação de amplificação com abertura, também são conhecidos. Ensaios de PCR homogêneos incluem ensaios de ponto de término (*end-point*) e ensaios em tempo real, nos quais o produto amplificado é detectado durante alguns ou todos os ciclos térmicos à medida que a reação se processa. Veja Patentes U.S. 5.994.056, 5.487.972, 5.925.517 e 6.150.097.

[003] Reações de amplificação por PCR geralmente são projetadas para serem simétricas, isto é, fazer amplicons fita dupla utilizando um primer dianteiro e um primer reverso que são "combinados"; isto é, eles têm temperaturas de fusão que são tão próximas quanto possível e eles são adicionados à reação em concentrações equimolares. Uma

técnica que tem encontrado uso limitado para fazer DNA fita simples diretamente em uma reação de PCR é "PCR assimétrica". Gyllensten e Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988); e Patente U.S. 5.066.584. A PCR assimétrica difere a PCR simétrica pelo fato de que um dos primers é adicionado em quantidade limitada, tipicamente 1-20 por cento da concentração do outro primer.

[004] Mais recentemente, nós desenvolvemos um método de amplificação por PCR não-simétrica conhecido como PCR "Linear-Após-O-Exponencial" ou, em resumo, "LATE-PCR". Veja Sanchez e colaboradores (2004) PNAS 101: 1933-1938, Pierce e colaboradores (2005) PNAS 102: 8609-8614 e pedido de patente internacional publicado WO 03/054233 (3 de Julho de 2003), o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade. LATE-PCR leva em conta as temperaturas de fusão reais dos primers de PCR no início de amplificação, referidas como $T_{m[0]}$. A $T_{m[0]}$ pode ser determinada empiricamente, conforme é necessário, quando nucleotídeos não-naturais são usados ou calculada de acordo com o método do "vizinho mais próximo" (Santa Lucia, J. (1998) PNAS (USA) 95: 1460-1465; e Allawi, H. T. e Santa Lucia, J. (1997) Biochem. 36: 10581-10594) usando um ajuste na concentração de sal. Em nosso trabalho, nós utilizamos uma concentração de sal monovalente de 0,07M.

[005] Uma característica indesejável de amplificações por PCR, reduzida no caso de LATE-PCR, é a dispersão entre réplicas. Após a fase exponencial da amplificação,

amplificações de réplicas seguidas em tempo real divergem e atingem um platô em diferentes níveis. Dispersão indica que as réplicas não têm a mesma cinética de reação e reduz a precisão. Isso é um problema para ensaios de PCR em geral, mas particularmente para ensaios de ponto de término (*end-point*) e ensaios que dependem do declínio de sinal durante a fase linear.

[006] Outro problema significativo com amplificações por PCR é a iniciação errônea, a qual nós acreditamos que se manifesta em pelo menos três tipos: Tipo 1, iniciação errônea que ocorre durante preparo das misturas de reação antes do início de amplificação; Tipo 2, iniciação errônea que ocorre durante amplificação se as temperaturas de ciclo incluem qualquer temperatura significativamente abaixo da temperatura de fusão de um primer; e Tipo 3, iniciação errônea que ocorre nos últimos estágios de uma amplificação por PCR que é continuada após uma alta concentração de amplicon ter sido feita. Várias abordagens têm sido usadas para se dirigir ao primeiro tipo de iniciação errônea. Uma abordagem é modificar a polimerase quimicamente de modo que ela fique inativa até aquecida para uma temperatura elevada, tal como 95 °C. Veja Patentes U.S. 5.677.152 e 5.773.258. Outra abordagem é ligar um anticorpo à polimerase para inibir a polimerase até que a reação seja aquecida para uma temperatura elevada, tal como 95 °C, para desnaturar irreversivelmente o anticorpo. Veja Patente U.S. 5.338.671. Ainda outra abordagem é incluir um aptâmero na mistura de reação. Veja Doug e Jayasena (1996), J. Mol. Biol. 264: 268 - 278 e Patente U.S. 6.020.130. Um aptâmero é um oligonucleotídeo

fita-simples de aproximadamente 30 nucleotídeos de comprimento que se liga a uma polimerase e inibe sua capacidade de estender uma extremidade 3' rebaixada em baixas temperaturas. Aptâmeros não são irreversivelmente desnaturados a 95 °C, uma temperatura mais elevada típica para um ciclo de PCR. Kainz e colaboradores (2000) *Biotechniques* 28: 278-282 reportaram que a adição de misturas de reação de PCR de fragmentos de DNA fita dupla tendo comprimentos de 16-21 nucleotídeos em determinadas quantidades inibe as polimerases em temperaturas abaixo das temperaturas típicas de extensão em PCR e suprime a síntese de produtos não-específicos. Fragmentos de DNA não são irreversivelmente desnaturados durante ciclicização em PCR. A Eppendorf-5 Prime, Inc. comercializa um ligante patenteado que é mencionado como se ligando à Taq polimerase de uma maneira temperatura-dependente e inibe sua ligação ao DNA fita dupla em temperaturas abaixo de cerca de 50 °C. Apesar dessas muitas tentativas, iniciação errônea permanece um problema com amplificações por PCR.

[007] Outra manifestação de iniciação errônea durante amplificação por PCR é conhecida como formação e amplificação de primer-dímero. De acordo com esse fenômeno, um primer se hibridiza ao outro primer ou a si mesmo e, então, sofre extensão da extremidade 3' para gerar um pequeno amplicon fita dupla o qual pode, então, amplificar adicionalmente ou pode multimerizar e amplificar adicionalmente. Formação de primer-dímero pode ocorrer na ausência de alvo.

[008] Análise quantitativa de amplificações por PCR tem

sido permitida por meio de métodos de detecção em tempo real, uma vez que o ciclo de PCR no qual o sinal fluorescente se torna visível acima do ciclo de limiar ou C_T de reações é indicativa de concentrações do alvo de iniciação. Análises de ponto de término (*end-point*) são semi-quantitativas no máximo em virtude, em parte, da dispersão entre réplicas à medida que a reação sai da amplificação exponencial. Análise eletroforética de amplicons fita dupla é semi-quantitativa e pode utilizar primers fluorescentemente rotulados. Análise de ponto de término (*end-point*) utilizando sondas fluorescentemente rotuladas, quer sondas de discriminação de alelo ou sondas tolerantes à combinação errônea, também são semi-quantitativas no máximo. Reduzindo a dispersão e produzindo um produto fita simples, LATE-PCR oferece um aperfeiçoamento significativo em análise de ponto de término (*end-point*), mas a dispersão entre réplicas freqüentemente não é completamente eliminada, deixando a detecção quantitativa de multiplex menos precisa do que o desejado.

[009] Um aspecto da presente invenção é uma classe de aditivos reagentes para melhorar a especificidade do produto e eliminar os efeitos de iniciação errônea em reações de amplificação por PCR. Esses aditivos superam as metodologias de "início a quente" existentes em todos os tipos de PCR e podem ser usados para impedir o acúmulo de produtos indesejados, incluindo primer-dímeros e amplicons erroneamente iniciados, em estágios precoces da reação e durante reações de LATE-PCR tendo muitos ciclos (tipicamente 60 ciclos e mais).

[010] Outro aspecto da presente invenção é uma amplificação por PCR e métodos de ensaio, PCR simétrica ou PCR não-simétrica incluindo, mas não limitado a, LATE-PCR, e kits, kits parciais e conjuntos de oligonucleotídeo que incluem tais aditivos reagentes.

SUMÁRIO

[011] Reagentes de acordo com a presente invenção são aditivos que são capazes de impedir uma ou mais manifestações de iniciação errônea em pelo menos algumas amplificações por PCR. Por "impedir uma manifestação" entenda-se que um produto ou produtos de iniciação errônea não são detectados ao final de uma reação por meio de técnicas descritas aqui, isto é, corante de DNA fluorescente, eletroforese em gel, seqüenciamento de DNA e análise de ponto de fusão. Os reagentes de acordo com a presente invenção podem ser incluídos em misturas de amplificação por PCR antes do início da amplificação em uma concentração relativamente baixa, menos do que 1 micromolar (μM), isto é, 1000 nM, de preferência não mais do que 650 nanomolar (nM), mais preferivelmente não mais do que 300 nM e, ainda mais preferivelmente, 50-250 nM, mesmo quando utilizando polimerases que têm atividade de polimerização e atividade de exonuclease 5' - para - 3'. Os reagentes de acordo com a invenção são oligonucleotídeo fita simples modificados. Oligonucleotídeos que podem ser utilizados para construir reagentes de acordo com a presente invenção são oligonucleotídeo de modo geral. Eles podem ser DNA, RNA ou DNA-RNA misturados. Eles podem conter nucleotídeos modificados, nucleotídeos não-naturais, por exemplo, 2'-O-metil ribonucleotídeos, ligações internucleotídeo não-

naturais, ligantes não-nucleotídicos, PNA, LNA e porções químicas adicionadas, tais como nucleotídeos revestidos descritos pela Glenn Research.

[012] Os reagentes de acordo com a presente invenção são oligonucleotídeo fita simples que formam uma estrutura de haste-e-alça, comumente referida como uma estrutura de "hairpin", em uma mistura de reação de amplificação por PCR, embora eles também possam ser compreendidos de uma estrutura de haste-e-alça em que a alça não é compreendido de nucleotídeos. Em tal estrutura, uma parte central da molécula permanece fita-simples (não hibridizada) (a alça) e as extremidades se hibridizam umas às outras para formar a haste. Uma haste pode ter a extremidade cega ou uma fita pode se estender além da extremidade da outra. Uma haste pode compreender uma região fita dupla contínua ou pode incluir uma combinação errônea interna, causando uma saliência. A extremidade da haste formada pelos términos do oligonucleotídeo é estabilizada de modo a ser mais hermeticamente ligada do que um híbrido de DNA-DNA. Nós caracterizamos a haste de um reagente de acordo com a invenção através de referência à sua temperatura de fusão ou T_m . A temperatura de fusão é aquela temperatura, em graus centígrados, na qual 50% das seqüências complementares da haste não são hibridizadas (configuração aberta) e 50% das seqüências complementares são hibridizadas ou parcialmente hibridizadas a si mesmas (configuração fechada). No presente pedido, a " T_m calculada" de uma haste significa a temperatura de fusão calculada da porção de haste do oligonucleotídeo de DNA completo não estabilizado, correspondente obtido usando o

programa M-fold: Zucker, M. (2003). "Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction", Nucl. Acids Res. 31: 3406-3415, admitindo uma concentração de sódio de 70 milimolar (mM) e uma concentração de magnésio de 3 mM. No caso de modalidades preferidas que tenham adicionado pares de corante silenciador, de preferência corantes silenciadores não fluorescentes, tais como Corantes Silenciadores Dabcila e Black Hole, que absorvem luz mas emitem energia absorvida como calor, a T_m é a T_m calculada do "hairpin" de DNA sem os corantes silenciadores. No caso de modalidades que têm nucleotídeos revestidos em seus términos, a T_m é a T_m calculada do "hairpin" de DNA contendo os nucleotídeos não revestidos equivalentes. No caso de inclusões de 2'-O-metil ribonucleotídeo em uma extremidade da haste, a T_m é a T_m calculada do "hairpin" de todo DNA contendo análogos de deóxiribonucleotídeo dos 2'-O-metil ribonucleotídeos. Nós utilizamos essa metodologia pela razão prática de que o ponto de fusão real será vários graus maior do que a T_m calculada, em virtude da modificação de estabilização. Os reagentes de acordo com a presente invenção têm uma T_m calculada da haste que não excede a 94 °C e, de preferência, está na faixa de 50-85 °C. Para algumas modalidades, nós preferimos uma T_m calculada da haste que é maior do que a temperatura de anelamento do primer (tipicamente 55-72 °C de uma reação de amplificação, isto é, na faixa de 72-85 °C) mas, em outras modalidades, nós preferimos uma T_m calculada da haste que é menor do que a temperatura de anelamento do primer, isto é, na faixa de 50-71 °C. As seqüências complementares de abertura da haste

se tornam fita simples a 95 °C, a temperatura usada para fusão de fita durante ciclização de PCR. Ainda, a haste de reagentes de acordo com a presente invenção tem um comprimento excedendo seis nucleotídeos em temperaturas baixas o bastante para formação de uma confirmação fechada, auto-hibridizada. Atualmente, nossas modalidades preferidas formam hastes que têm 9-12 pares de base de comprimento, de preferência 9-11 pares de base, quando fechados, mais preferivelmente 9-12, ainda mais preferivelmente 9-11 pares de base complementares contínuos sem combinações errôneas internas, mais preferivelmente hastes com extremidade cega que têm 9-12 pares de base de comprimento e são perfeitamente complementares. O 3' término do reagente é não extensível por uma DNA polimerase na reação de amplificação, de modo que a reação não é um primer de PCR. Qualquer extremidade 3' saliente é bloqueada para impedir extensão, por exemplo, através de adição de um fosfato ou alguma porção química de bloqueio.

[013] O comprimento da alça pode ser variado consideravelmente. Se uma alça consiste de nucleotídeos e ligações inter-nucleotídeo, ele tem pelo menos três nucleotídeos de comprimento. Ainda, se ele tem apenas três nucleotídeos de comprimento, ele contém um resíduo de timidina. Nossas alças de nucleotídeo presentemente preferidos têm comprimentos na faixa de 3-22 nucleotídeos. Alças também podem ser ligantes químicos não-nucleotídicos, por exemplo, cadeias de alquilenos. Para ligantes com cadeia de carbono, nós preferimos um comprimento de 3-6 átomos de carbono e um comprimento mais preferido de 3 átomos de carbono. Em cadeias de alquilenos, os dois elétrons com

valência restantes de cada membro da cadeia de carbono também estão envolvidos em ligações covalentes. Tais ligações podem ser a átomos de hidrogênio, a grupos alquila ou alquilenos de cadeia curta, a substituintes para ligação do reagente a uma superfície sólida. Alças não-oligonucleotídicas compreendendo ligantes químicos não estão limitados à cadeias de hidrocarboneto e podem incluir hetero átomos (não carbono ou hidrogênio). Nós preferimos que os ligantes químicos sejam eletricamente neutros, de modo a não se ligar à polimerase. Em virtude do fato de a atividade do reagente depender da confirmação fechada da haste, é preferido que a composição da alça, para reagentes tendo alças de mais de 5 nucleotídeos, não seja extensivamente complementar a qualquer outra sequência ou sequências na reação ou geradas pela reação. Um reagente de acordo com a invenção não é uma sonda de hibridização para qualquer produto da reação de amplificação e não sinaliza acúmulo de produto.

[014] Conforme indicado, os reagentes de acordo com a invenção incluem estabilização da extremidade da haste remota da alça, de modo que a extremidade do haste é mais hermeticamente ligada do que a extremidade de um híbrido de DNA-DNA. Em nossas modalidades presentemente mais preferidas, a haste tem a extremidade cega e o término da haste é modificado de uma maneira que inibe a separação parcial de fita comparado com um híbrido de DNA-DNA natural. Nós demonstramos abaixo o efeito da adição de porções químicas interativas de estabilização às extremidades da haste, um par de porções Dabcila covalentemente ligado aos nucleotídeos 3' e 5' da haste por

meio de um ligante comercial e um par de corantes silenciadores Black Hole™ comercialmente disponível (corantes silenciadores patenteados comercializados pela Biosearch Technologies, Novato, CA, E.U.A.). Nós também demonstramos o efeito de utilização de nucleotídeos não-naturais fortemente ligados, 2'O-metil ribonucleotídeos, na extremidade da haste. Porções de estabilização preferidas são não-fluorescentes, de modo que os reagentes não contribuem com fluorescência de base para as amplificações e ensaios de amplificação. "Hairpins" de DNA de oligonucleotídeo não estabilizado dos reagentes de acordo com a presente invenção, adicionadas em concentrações abaixo de 1 μ M, não precisam reduzir substancialmente a iniciação errônea se não modificadas, conforme descrito, para estabilizar o término da haste ligado a hidrogênio e, em muitos casos, não são assim. Assim, a estabilização é essencial em reagentes de acordo com a presente invenção.

[015] Reagentes de "hairpin" de acordo com a presente invenção podem ser descritos como moléculas que contêm dois oligômeros de nucleotídeo complementares que são mantidos juntos de modo que eles podem formar uma haste de mais de 6 pares de base e a extremidade aberta da haste é quimicamente modificada por um meio ou outro, de modo que a tendência da haste de desenrolar ou "desfiar" em sua extremidade aberta é suprimida. Embora uma compreensão completa do mecanismo de ação molecular aguarde análise adicional via cinética enzimática na presença e ausência de reagentes de acordo com a presente invenção, bem como análise estrutural da interação de tais reagentes com a polimerase via microscopia eletrônica, ressonância

magnética nuclear e cristalografia de raios X, uma compreensão parcial do mecanismo pode ser prevista baseado na informação apresentada aqui e na literatura científica. A literatura ensina que Taq polimerase, semelhante a outras DNA polimerases, é compreendida de um domínio sintético e um domínio 5' exonucleolítico. O domínio 5' exonucleolítico não está presente no fragmento de Stoffel. A literatura ainda ensina que o domínio sintético realiza polimerização de DNA primeiro através de ligação a e deslocamento ao longo do DNA fita dupla. O domínio sintético tem um formato que foi comparado a uma "mão aberta" a qual, na presença de dNTP's, sofre uma alteração de formato a nível de polipeptídeo quando de contato com o DNA fita dupla. Como um resultado, os "dedos" da "mão" "se fecham" em torno da molécula de DNA fita dupla. Sequências erroneamente combinadas dentro de uma molécula fita dupla fazem com que a polimerase recue para alguns nucleotídeos e substitua a base correta usando a função de 3' editor do domínio sintético. A síntese de uma nova fita de DNA ocorre à medida que a enzima encontra uma cauda 5' de um oligonucleotídeo já ligado à fita modelo e a polimerase pode invadir a região do oligonucleotídeo ligado em 1-2 nucleotídeos e clivar a cauda 5' resultante por meio do domínio de 5' exonuclease da enzima.

[016] Baseado nessa informação, pode ser teorizado que a haste fita dupla de um reagente de acordo com a invenção funciona, pelo menos em parte, através de ligação ao domínio sintético da polimerase na conformação aberta e faz com que ele se feche. A atividade sintética da polimerase é, desse modo, inibida. Assim, embora não se deseje estar

preso a qualquer teoria, pode ser postulado que o Primeiro Modo de ação é como um inibidor temperatura-dependente da atividade sintética da polimerase. A evidência apresentada abaixo indica que pelo menos algumas versões dos reagentes não são liberadas pela enzima na temperatura de fusão de suas regiões fita dupla, por exemplo, hastes, mas permanecem ligadas em temperaturas maiores, incluindo especialmente temperaturas típicas de extensão em PCR. Durante a etapa de desnaturação (ou fusão de fita) de um ciclo de PCR, contudo, os reagentes da presente invenção se tornam não ligados da DNA polimerase. Durante a etapa de desnaturação dos ciclos de PCR (também referida como a etapa de fusão de fita), tipicamente acima de 90 °C, as hastes dos reagentes de "hairpin" de acordo com a presente invenção se fundem separadamente e eles se ligam novamente à polimerase apenas se e quando a temperatura cai suficientemente para que a região fita dupla se reforme. Portanto, pode-se escolher projetar um reagente de acordo com a presente invenção que é fita dupla apenas até a primeira desnaturação, isto é, é fita dupla quando adicionado a uma mistura de reação de PCR antes de amplificação (comumente em temperatura ambiente), mas é, após o que, mantida acima da T_m de sua haste. Para tal modalidade, a temperatura de anelamento de primer de todos os ciclos de amplificação e qualquer temperatura de detecção em LATE-PCR em baixa temperatura são maiores do que a T_m calculada da haste, de preferência em pelo menos 5 °C. Alternativamente, pode-se escolher projetar um reagente de acordo com a presente invenção que se torna novamente fita dupla posteriormente durante amplificação. Isso pode

ser realizado utilizando uma T_m da haste (calculada conforme descrito) que é maior do que a temperatura de anelamento de primer usada em todos ou alguns ciclos de amplificação. Alternativamente, em amplificação por LATE-PCR, isso pode ser realizado utilizando uma T_m da haste que está abaixo da temperatura de anelamento de primer, mas maior do que uma temperatura de detecção em baixa temperatura. O primeiro tipo de design geralmente não inibirá a polimerização, conforme indicada por um retardo no C_T , enquanto que utilização de uma temperatura de anelamento de primer abaixo da T_m da haste resultará em um retardo modesto do C_T de 1-3 ciclos de amplificação.

[017] Ainda, embora não se deseje estar preso a qualquer teoria, pode ser postulado que um Segundo Modo de ação dos reagentes de acordo com a presente invenção é como um inibidor temperatura-dependente da atividade 5' exonucleolítica da polimerase. Nós mostramos abaixo que os reagentes de acordo com a presente invenção inibem a atividade de 5' - para - 3' exonuclease da enzima polimerase em temperaturas de até pelo menos 55 °C e assim o fazem sem supressão indevida da capacidade da enzima de estender uma fita de DNA através de polimerização de sua extremidade 3' (como primers de PCR são estendidos em amplificações por PCR).

[018] Além disso, embora não se deseje estar preso a qualquer teoria, pode ser postulado que um Terceiro Modo de ação dos reagentes de acordo com a presente invenção é como um ligante temperatura-dependente que se liga à polimerase, fazendo com que os polipeptídeos da polimerase mudem de formato. Uma vez que o ligante é liberado da enzima, a

enzima permanece no formato alterado durante algum tempo antes de retornar para seu formato inicial. Embora no formato alterado a enzima se ligue, de preferência, à híbridos de primer-modelo completamente complementares, quando comparado a híbridos de primer-modelo erroneamente combinados de modo parcial.

[019] Baseado nesse modelo, pode ser previsto que a capacidade da haste de reagentes de acordo com a invenção se mudar o formato do domínio sintético da polimerase é diferente da capacidade dos reagentes de acordo com a presente invenção de inibir a função sintética da polimerase (Primeiro Modo, acima) ou a função de 5' exonuclease da polimerase (Segundo Modo, acima). O Primeiro Modo e o Segundo Modo de ação realmente dependem da taxa na qual o reagente ligado é liberado pela polimerase. Os reagentes de acordo com a presente invenção os quais são liberados rapidamente atuam, de preferência, através do Terceiro Modo, sem inibição significativa da atividade sintética da polimerase, mesmo em alta concentração. Em contraste, os reagentes de acordo com a presente invenção os quais são liberados da polimerase lentamente são, provavelmente, inibitórios em alta concentração. À guisa de exemplo, nem o composto 12-C3DD compreendido de uma haste e uma alça de carbono-ligante de três grupos metileno ($-CH_2-$) nem o composto 12-C3 C3DD compreendido de uma haste e uma alça de carbono-ligante de seis grupos metileno ($-CH_2-$) apenas inibem parcialmente a amplificação por PCR em concentrações de 3000 nM. Em contraste, os reagentes de acordo com a presente invenção tendo alças compreendidos de nucleotídeos inibem, tipicamente, a amplificação por PCR

completamente em uma concentração de < 1000 nM e, algumas vezes, em concentrações menores do que < 500 nM no ensaio do Exemplo 1.

[020] Conforme aqueles familiarizados com interações de proteína-ácido nucléico apreciarão, a ação de um reagente de acordo com a presente invenção pode ser mais do que um dos Modos 1-3, os quais não são mutuamente excluídos, mas antes, são relativos. Conforme descrito abaixo, nós planejamos um teste quantitativo (Exemplo 14) que pode ser usado para determinar a extensão na qual uma estrutura molecular em particular ligando os dois oligonucleotídeos compreendendo a haste faz com que o composto completo atue como um inibidor enzimático (via o Primeiro Modo ou o Segundo Modo) ou primariamente como um intensificador de especificidade enzimática, o Terceiro Modo de ação.

[021] Baseado no modelo acima, pode ser ainda previsto que uma ou mais moléculas de polimerase podem ser ligadas a um número igual de moléculas de um reagente de acordo com a presente invenção o qual, por sua vez, é covalentemente ligado a uma porção maior tal como glóbulo, partícula ou material feito de um material sólido. O sólido poderia, desse modo, ser considerado como sendo "carregado" com uma polimerase. A ligação de reagentes de acordo com a presente invenção ao sólido poderia ser temporariamente ou poderia ser clivável por uma variedade de meios conhecidos na técnica. Clivagem da ligação liberaria o reagente ou complexo de reagente-polimerase em solução (subseqüentemente, o reagente poderia ser liberado da polimerase).

[022] O design de reagentes de acordo com a presente invenção está dentro da capacidade da técnica. Será

apreciado que a temperatura de fusão de uma haste pode ser ajustada consideravelmente através de variação de seu teor de G-C. Por exemplo, hastes de duas modalidades preferidas descritas abaixo têm um comprimento de nove nucleotídeos, mas eles têm T_m 's calculadas que diferem em 25 °C (81 °C e 56 °C). Nós comumente usamos o programa de software de computador M-fold mencionado acima para cálculo da T_m da haste, em conjunto com uma ou mais possíveis seqüências de alça. Descobriu-se, de outro modo, que a seqüência de alça não é significativa em reagentes de iniciação errônea de acordo com a presente invenção. Em nosso design, nós utilizamos uma seqüência que forma uma haste com extremidade cega perfeito, isto é, uma haste sem nenhuma combinação errônea interna e nenhuma saliência terminal. Se pudesse, então, através de simples exame, avaliar o efeito de introdução de uma combinação errônea interna (uma combinação errônea terminal é desestabilizante e não aceitável, conforme mostrado no Exemplo 1) ou uma curta extensão de um ou, no máximo, dois nucleotídeos além da região fita dupla.

[023] A construção de reagentes de acordo com a presente invenção está dentro da capacidade da técnica. Por exemplo, seqüências de oligonucleotídeo podem ser preparadas sobre um sintetizador de oligonucleotídeo. Porções de estabilização podem ser incluídas usando métodos conhecidos. Por exemplo, Dabcila's podem ser adicionados, convenientemente, começando com uma coluna dabcilada (Glenn Research) e concluindo a síntese com um nucleotídeo Dabcila-modificado. Nucleotídeos não-naturais podem ser usados como os primeiro e penúltimo nucleotídeos da

síntese.

[024] Uma vez que um reagente é projetado e construído, a temperatura de fusão de sua haste pode ser aproximada empiricamente, em alguns casos, através da adição de um corante de ligação a DNA fluorescente e realizando-se uma análise de fundido ao mesmo tempo em que se estimula o corante (reconhecendo que o corante em si tem um efeito sobre a T_m). Também, informação útil prática com relação à temperatura de fusão real de uma haste estabilizado de um reagente de acordo com a presente invenção pode, em muitos casos, ser obtida inferencialmente realizando-se amplificações por PCR em tempo real utilizando diferentes temperaturas de anelamento. Ajustes no comprimento da haste ou teor de G-C podem ser feitos, se necessário, para obter uma T_m desejada. Nós, então, avaliamos os efeitos de um reagente candidato sobre várias manifestações de iniciação errônea e a eficácia de amplificação determinando seu desempenho em uma amplificação por PCR rigorosa, tal como descrito abaixo no Exemplo 1. Um reagente candidato é julgado como sendo um reagente de acordo com a presente invenção se, quando incluído na mistura de reação do Exemplo 1 em alguma concentração abaixo de 1000 nM, de preferência não mais do que 650 nM, um amplicon claro é obtido (veja FIG. 1). Nós avaliamos ensaios candidatos usando o ensaio do Exemplo 1, exceto com o alvo pretendido e primers pretendidos. Contudo, amplificações e ensaios (amplificação mais detecção) de acordo com a presente invenção não estão limitados às condições ou procedimentos do Exemplo 1. Embora um reagente de acordo com a presente invenção deva inibir pelo menos uma manifestação de

iniciação errônea quando adicionado em uma concentração abaixo de 1000 nM comparado com uma concentração de polimerase (Exemplo 1) de 1,25 unidades por 25 μ l de mistura de reação, o reagente pode ser usado em qualquer concentração com relação à concentração de polimerase na qual ele é eficaz; isto é, qualquer concentração (ou concentração relativa) na qual ele impede iniciação errônea, mas não impede substancialmente a amplificação. Utilização dos primers pretendidos na avaliação revelará consequências inesperadas, tal como falha em bloquear a extremidade 3' do reagente ou uma complementaridade negligenciável.

[025] A presente invenção inclui reações de amplificação por PCR e ensaios que incluem reações de amplificação por PCR, incluindo reações em que a mistura de reação de amplificação inclui uma DNA polimerase termoestável tendo atividade de polimerização e atividade de 5'-3' exonuclease, tal como Taq DNA polimerase e em que pelo menos um reagente de acordo com a presente invenção é incluído na mistura de reação de amplificação. Muitos reagentes de acordo com a presente invenção inibem a atividade da polimerase e são adicionados em uma concentração relativa à concentração de polimerase dentro das faixas descritas acima antes de ou durante ciclização térmica, isto é, não mais do que 1000 nM, de preferência não mais do que 650 nM para uma reação contendo 1,25 unidades de DNA polimerase por 25 μ l de volume de reação. Alguns reagentes de acordo com a presente invenção, embora eficazes em concentrações abaixo de 1000 nM e, de preferência, em concentrações abaixo de 650 nM, inibem a

atividade da polimerase em um grau menor e podem ser adicionados em concentrações de até 1500 nM ou mesmo 3000 nM para tal concentração de polimerase. Em ensaios contendo mais de um reagente de acordo com a presente invenção, cada reagente pode ter uma haste com sua própria T_m ou pode ser adicionado em sua própria concentração, de modo que diferentes reagentes funcionam em diferentes partes das etapas do processo de amplificação. Se um reagente da presente invenção é adicionado durante ciclicização térmica, ele deverá ser adicionado sem aspiração da mistura de reação para a área de trabalho. Tais reações de amplificação incluem amplificações por PCR simétricas, amplificações por PCR assimétricas e amplificações por LATE-PCR, qualquer uma das quais pode ainda incluir transcrição reversa, se alvos de RNA estão envolvidos. Amplificações por PCR podem ser usadas para preparar um produto amplificado para qualquer finalidade, por exemplo, como um material de iniciação para seqüenciamento de dideóxi. Amplificações por PCR podem ser combinadas com detecção de produto amplificado em um ensaio, incluindo particularmente ensaios homogêneos empregando primers rotulados, sondas rotuladas ou corantes de ligação a DNA fluorescentes, tais como SYBR Green ou brometo de etídio. O ensaio pode ser um ensaio em tempo real no qual leituras de detecção são tomadas durante múltiplos ciclos de amplificação ou um ensaio de ponto de término (*end-point*) no qual a detecção é realizada após o término de amplificação. Ele pode ser qualitativo ou quantitativo incluindo, mas não limitado a, um ensaio de ponto de término (*end-point*) quantitativo. O ensaio pode ser

projetado para amplificar um produto fita dupla ou fita simples ou mais de um produto fita dupla, com ou sem produtos fita simples relacionados.

[026] Conforme usado no presente pedido, "LATE-PCR" significa uma amplificação de DNA não-simétrica empregando o processo de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando um primer de oligonucleotídeo (o "Primer em Excesso") em um excesso de pelo menos cinco vezes com relação ao outro primer (o "Primer Limitado") o qual é, em si, utilizado em baixa concentração, de até 200 nM, de modo a ser esgotado em ciclos de PCR aproximadamente suficientes para produzir um amplicon fita dupla fluorescentemente detectável, em que a temperatura de fusão concentração-ajustada do Primer Limitado no início de amplificação, $T_{m[0]}$, é maior do que ou não mais do que 5 °C abaixo da temperatura de fusão concentração-ajustada do Primer em Excesso no início de amplificação, $T_{m[0]}^X$, de preferência 3-10 °C maior; e em que a ciclização térmica é continuada durante múltiplos ciclos após esgotamento do Primer Limitado para produzir um produto fita simples, isto é, o produto da extensão do Primer em Excesso. Ensaios de LATE-PCR incluem uma etapa de detecção em baixa temperatura na qual a temperatura é reduzida abaixo da temperatura de anelamento de primer durante pelo menos alguns ciclos de amplificação linear. De preferência, tal etapa ocorre após extensão antes de fusão de fita.

[027] A presente invenção também inclui kits de PCR, kits parciais e conjuntos de oligonucleotídeo. Um kit de amplificação por PCR completo inclui pelo menos todos os reagentes para realização de uma amplificação por PCR ou

ensaio, incluindo pelo menos um par de primers de PCR, dNTP's, tampão de reação, DNA polimerase termoestável, de preferência uma polimerase tendo atividade de 5'-para-3' exonuclease e pelo menos um reagente de acordo com a presente invenção. Um kit completo para um ensaio de PCR homogêneo inclui ainda quaisquer reagentes de detecção adicionais que são necessários, por exemplo, um corante de DNA fluorescente ou sondas fluorescentemente rotuladas. Um kit completo de qualquer tipo inclui, de preferência, reagentes para preparo de amostra e pode incluir, em algumas modalidades, uma transcriptase reversa. Kits parciais de acordo com a presente invenção omitem pelo menos alguns ingredientes de um kit completo, mas incluem pelo menos uma DNA polimerase termoestável (e, se necessário, transcriptase reversa) e pelo menos um reagente de acordo com a presente invenção. Por exemplo, produtos comercialmente conhecidos como "mistura mestre" ou "kit básico" omitem, tipicamente, primers de PCR e sondas. Um kit parcial preferido inclui todos os reagentes necessários para amplificação ou ensaio, exceto quanto ao preparo da amostra. Conjuntos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção incluem pelo menos um par de primers de PCR e pelo menos um reagente de acordo com a presente invenção. Eles podem ainda incluir sondas de oligonucleotídeo ou primers de seqüenciamento.

[028] Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são apresentados nos desenhos em anexo e na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição e desenhos e das reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[029] A FIG. 1 mostra uma análise de eletroforese em gel de amostras de um ensaio de PCR rigoroso qualitativo para erros de iniciação errônea projetado para testar a atividade inibitória dos reagentes descritos na presente invenção.

[030] A FIG. 2 mostra que os reagentes de acordo com a presente invenção permitem ensaios de ponto de término (*end-point*) e em tempo real PCR-baseados.

[031] A FIG. 3 retrata a SEQ. ID. NO. 50 e mostra uma cromatografia de sequência de DNA obtida de produtos de DNA fita simples gerados após 70 ciclos de amplificação por LATE-PCR na ausência de erros de iniciação errônea usando os reagentes descritos na presente invenção.

[032] A FIG. 4 mostra o efeito do composto 9-3 DD sobre uma amplificação por LATE-PCR pentaplex.

[033] A FIG. 5 mostra evidência de que, uma vez que os reagentes de acordo com a invenção se ligam à Taq polimerase, eles não são liberados da polimerase até que as temperaturas de ciclização de PCR atinjam a etapa de desnaturação.

[034] A FIG. 6 mostra uma comparação direta de reagentes de acordo com a presente invenção com relação a seu efeito sobre a atividade de DNA polimerase a 25 °C.

[035] A FIG. 7 ilustra um ensaio para avaliar o efeito dos reagentes de acordo com a presente invenção sobre uma atividade de exonuclease de polimerase na ausência de atividade de polimerase.

[036] A FIG. 8 ilustra a capacidade de um reagente de acordo com a presente invenção de impedir iniciação errônea

em um ensaio de PCR simétrico.

[037] A FIG. 9 ilustra um ensaio para quantificação de inibição de exonuclease.

[038] A FIG. 10 mostra o efeito dose-dependente de um reagente de acordo com a presente invenção sobre a formação de primer-dímeros e primer-oligômeros em uma amplificação por LATE-PCR.

[039] A FIG. 11 mostra o efeito de uma baixa concentração de reagente 9-22 DD sobre amplificações por LATE-PCR duplex de duas seqüências alvo com dois pares de primer.

[040] A FIG. 12 mostra o efeito de variação da composição da haste do reagente 9-3 DD sobre uma amplificação por LATE-PCR duplex de duas seqüências alvo com dois pares de primers.

[041] A FIG. 13 mostra o efeito de variação da concentração de reagente 9-3b DD sobre amplificação por LATE-PCR duplex de duas seqüências alvo com dois pares de primers.

[042] A FIG. 14 mostra o efeito de aumento das concentrações de reagente 9-3 DD sobre a eficácia de uma amplificação por LATE-PCR em termos de valores de C_T .

[043] A FIG. 15 mostra o efeito de aumento das concentrações de reagente 9-3 DD sobre a eficácia de uma amplificação por LATE-PCR em termos de declínio do sinal fluorescente e fluorescência final.

[044] A FIG. 16 mostra produtos de uma reação multiplex realizada com e sem uma mistura de compostos de acordo com a presente invenção.

[045] A FIG. 17 mostra os resultados de um teste para a

ação do composto 12-3DD.

[046] A FIG. 18 mostra os resultados de um teste para a ação do composto 12-C3DD.

[047] Símbolos de referência semelhantes nos vários desenhos indicam elementos semelhantes.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[048] Conforme indicado acima, nós identificamos aquilo que nós acreditamos ser três tipos diferentes e causas de erros de iniciação errônea. Para avaliar a iniciação errônea de todos os três tipos, nós desenvolvemos o ensaio rigoroso do Exemplo 1 abaixo. A amplificação começa com DNA cisalhado, o qual promove iniciação errônea. Manipulação física, por exemplo, extração do DNA em uma pipeta, tende a cisalhar o DNA. Ainda, em virtude de apenas a iniciação errônea do Tipo 1 poder ser impedida por reagentes e métodos "de partida a quente", nós incluimos no ensaio muitos ciclos de temperatura (pelo menos 60). Além disso, nós incluimos uma etapa de detecção em baixa temperatura utilizada em alguns ensaios de LATE-PCR. Ainda, nós também reconhecemos a formação de primer-dímeros e sua oligomerização e amplificação adicionais como um tipo adicional de iniciação errônea. Formação e amplificação de primer-dímero pode ocorrer na presença e ausência de DNAs modelo adicionados e nós também desenvolvemos ensaios para esses fenômenos.

[049] Embora enzimas de partida a quente sejam eficazes apenas antes de início de amplificação em virtude de alterações irreversíveis que ocorrem quando de aquecimento para temperatura elevada, por exemplo, 95 °C, reagentes de iniciação errônea de acordo com a presente invenção não são

irreversivelmente desnaturados e poderiam ter efeitos positivos ou negativos, ou ambos, posteriormente na reação, se uma etapa em baixa temperatura é incluída.

[050] Pode-se projetar hastes tendo temperaturas de fusão, T_m 's, acima ou abaixo de temperaturas de ciclo em particular, com diferentes impactos sobre a amplificação. No planejamento de hastes, leva-se em conta, de preferência, que a fusão é um fenômeno dinâmico que ocorre sobre uma faixa de temperatura, com a T_m especificando a temperatura na qual cinquenta por cento das moléculas estão na forma fita dupla e cinquenta por cento estão na forma fita simples. Nós acreditamos que a ligação de algumas hastes fechados à polimerase desvia o equilíbrio entre moléculas que permanecem não ligadas à polimerase em favor de hastes mais fechados. Se nós queremos que a grande maioria das hastes seja fechada em uma temperatura de ciclo em particular, tal como a temperatura de anelamento de primer, nós geralmente começamos com uma haste de oligonucleotídeo não modificado tendo uma T_m calculada pelo menos 5 °C acima dessa temperatura, reconhecendo que modificação da haste de estabilização elevará a T_m real em vários graus. Inversamente, se nós queremos que a grande maioria das hastes seja aberta em uma temperatura de ciclo em particular, nós geralmente começamos com uma haste de oligonucleotídeo não modificado tendo uma T_m calculada de pelo menos 5 °C abaixo, de preferência pelo menos 10 °C abaixo, dessa temperatura de ciclo em particular, novamente reconhecendo que modificação da haste de estabilização provavelmente elevará a T_m real em vários graus.

[051] Utilizando um reagente em particular de acordo

com a presente invenção com diferentes temperaturas de anelamento de primer, pode-se ter diferentes efeitos sobre a eficácia de aminoácido, conforme nós demonstramos abaixo no Exemplo 5. Uma de nossas modalidades presentemente calculadas (composto 9-22 DD) discutida abaixo tem uma T_m calculada de 81 °C. Ela se fechará durante cada ciclo térmico de PCR típico, a medida que a temperatura é diminuída da temperatura de fusão de fita (por exemplo, 95 °C) para a temperatura de anelamento de primer (por exemplo, 55 °C). Um reagente com tal haste terá um efeito durante cada ciclo de amplificação. Outra de nossas modalidades presentemente preferidas (composto 9-3 DD) tem uma T_m calculada de 56 °C. Quando misturas de amplificação por PCR são preparadas em temperatura ambiente, esse reagente tem uma haste fechado e se liga à polimerase. Ele permanece ligado à medida que a temperatura é elevada o início de amplificação. Moléculas polimerase-ligadas de 9-3 DD se tornam não ligadas e abrem durante a etapa inicial em temperatura elevada e não se ligam à polimerase novamente, a menos que a temperatura seja suficientemente diminuída para que a haste das moléculas não ligadas se feche. Assim, mantendo a menor temperatura de ciclo a 65 °C, a haste não se reforma. Sob essas condições, essa modalidade funcionará pelo fato de que a amplificação como um reagente de partida a quente para impedir iniciação errônea que ocorre antes de início da amplificação. Contudo, se uma etapa de detecção em baixa temperatura é incluída, por exemplo, incubação a 40 °C após extensão em um ciclo de LATE-PCR para permitir hibridização de um sinalizador molecular de baixa temperatura ou outra sonda rotulada à fita simples

acumulada durante a fase linear de amplificação, a haste tendo uma temperatura de fusão calculada de 56 °C se fechará, permitindo que o reagente se ligue à polimerase novamente até que uma alta temperatura de fusão de fita seja obtida.

[052] O Exemplo 1 abaixo descreve um ensaio de LATE-PCR rigoroso que nós utilizamos para avaliar o desempenho de reagentes de acordo com a presente invenção. A FIG. 1 mostra que erros de iniciação errônea ocorrem não apenas com Taq DNA polimerases "regulares", isto é, DNA polimerases termoestáveis com atividade de exonuclease 5'-para-3', mas sem modificação por partida a quente (fileiras b e fileiras c), mas também com Taq polimerases de partida a quente (fileiras d e fileiras e). A FIG. 1 mostra ainda a eliminação de produtos não específicos formados em virtude de erros de iniciação errônea e a presença apenas do produto específico desejado, obtido através da adição de reagente 9-22 DD em uma concentração de 300 nM, não apenas à amplificações com polimerases de partida a quente (fileiras h e fileiras i), mas também para amplificações com Taq DNA polimerases regulares (fileiras f e fileiras g). A eficácia dos compostos 9-22 DD e 9-3 DD na supressão de iniciação errônea foi avaliada utilizando o ensaio descrito no Exemplo 1. Descobriu-se que ambos suprimem a iniciação errônea do Tipo 1. A baixa T_m calculada da haste de 9-3 DD (56 °C) permite que ele seja usado simplesmente como um reagente de partida a quente eficaz utilizando um protocolo de amplificação por PCR com todas as temperaturas de ciclo de 60 °C e acima. Permanecendo acima do ponto de fusão da haste, a haste não se reforma à medida que a

amplificação prossegue. O composto 9-3 DD não tem efeito inibitórios sobre a eficácia de polimerização quando assim usado. O Exemplo 5 abaixo é instrutivo a esse respeito. Ele compara amplificações utilizando reagente 9-3 DD e temperaturas de anelamento de 65 °C e 55 °C. Quando 65 °C foi utilizado, nenhum efeito sobre a eficácia de polimerização, conforme refletido pelo C_T , foi encontrado. Quando 55 °C foi utilizado, contudo, o C_T foi retardado. Isso é evidência de que se a temperatura é diminuída suficientemente para que a haste se feche e a polimerase seja envolvida, o envolvimento continua à medida que a temperatura é elevada para extensão de primer, mesmo se a temperatura de extensão do primer está acima da T_m da haste. Por outro lado, a T_m elevada da haste de 9-22 DD (81 °C) permite que a haste se reforme em um "hairpin" durante a etapa de anelamento de primer de cada ciclo de PCR. Ela impede a manifestação não apenas de iniciação errônea do Tipo 1, mas também de iniciação errônea do Tipo 2, iniciação errônea do Tipo 3 e formação de Primer-Dímero. Ela afeta a eficácia de polimerização um pouco, contudo, conforme evidenciado por um retardo de ciclo de 1,5 no ciclo de limiar (C_T) da amplificação por PCR acompanhada em tempo real com SYBR Green 1 ou uma sonda sinalizadora moléculas alvo-específica quando usada em uma concentração de 100 nM.

[053] A Tabela I no Exemplo 1 reporta a aplicação desse ensaio rigoroso a uma série de aditivos e ainda reporta a concentração mínima necessária para obter prevenção de manifestações de iniciação errônea, isto é, evitar os níveis detectáveis de produtos não específicos formados em

virtude de erros de iniciação errônea e a presença apenas do produto de amplificação específico desejado, tal como é mostrado nas fileiras f e g da FIG. 1, usando Taq polimerase regular ao invés de uma versão com partida a quente. Na Tabela I, os compostos são identificados por nosso sistema de nomenclatura. Moléculas de "hairpin" não modificadas são identificadas pelo comprimento de alça da haste. Por exemplo, o composto 6-22 tem um haste de seis nucleotídeos de comprimento e uma alça de vinte e dois nucleotídeos de comprimento. Em virtude do identificador de alça começar com um número ou ser apenas um número ("22" ou "3b"), a alça é nucleotídeos. Alças não-nucleotídicos são ainda especificados. O composto 12-C3C3 tem uma haste de vinte nucleotídeos de comprimento e uma alça que é uma cadeia de seis carbonos, isto é, uma cadeia de seis grupos metileno (CH_2). Várias modificações foram feitas em uma ou ambas as extremidades dos "hairpins" básicas. Essas são designadas por sufixos, onde 3D é uma Dabcila (5'-Dimetóxitritilóxi-5-[(N-4'-carbóxi-4-(dimetilamino)-azobenzeno)-aminohexil-3-acrilimido]-2'-deóxi Uridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita) adicionada ao nucleotídeo 3' terminal, 5D é uma Dabcila adicionada ao nucleotídeo 5' terminal, DD é uma Dabcila adicionada a ambos os nucleotídeos terminais, BHQBHQ é um Corante Silenciador Black Hole adicionado a ambos os nucleotídeos terminais, FF é um fluoroforo (nesse caso, FAM) adicionado a ambos os nucleotídeos terminais, AA é uma adenosina (A) adicionada a ambos os nucleotídeos terminais e TT é uma timidina (T) adicionada a ambos os nucleotídeos terminais.

[054] Assim como adições, várias modificações foram

feitas as hastes básicos. O sufixo 2'OM⁴ indica que quatro nucleotídeos terminais, os dois últimos sobre cada oligonucleotídeo da haste ou braço, foram alterados de deóxiribonucleotídeos para 2'-O-metil nucleotídeos. Para trocar a temperatura de fusão das hastes, nós alteramos o teor de G-C. Compostos nos quais a seqüência da haste, mas não o comprimento da haste, foi trocada são denotados por um designador em letra minúscula precedendo o sufixo modificador-terminal, por exemplo, 9-3b DD ou 9-3i DD. As seqüências de nucleotídeo, também mostrando alças de cadeia de carbono que foram usados para os vários compostos na Tabela I, são apresentadas na Tabela II. A Tabela I é instrutiva em vários aspectos. Ela mostra, por exemplo, que nesse ensaio, oligonucleotídeos de "hairpin" de DNA não modificado são não eficazes ou são eficazes apenas em altas concentrações, de 1000 nM ou maior. O oligômero 9-22 (haste com 9 nucleotídeos de comprimento, alça de 22 nucleotídeos de comprimento) era eficaz apenas em uma concentração de 3000 nM, a quantidade reportada para supressão de iniciação errônea pelo DNA fita dupla. oligômeros 6-22 (haste com 6 nucleotídeos de comprimento, alça de 22 nucleotídeos de comprimento) e 9-5 (haste com 9 nucleotídeos de comprimento, alça com 5 nucleotídeos de comprimento) não eram eficazes mesmo na concentração de 3000 nM. Contudo, quando o oligômero 9-22 foi modificado através da adição de porções Dabcila a ambas as extremidades da haste para criar o composto 9-22 DD, um reagente preferido de acordo com a presente invenção, apenas uma concentração de 50 nM era requerida para impedir manifestações de iniciação errônea. Quando o oligômero 9-3 foi similarmente modificado, apenas

uma concentração de 100 nM era requerida.

[055] A Tabela I mostra o efeito do comprimento da haste. Embora vários oligômeros tendo hastes de nove e doze nucleotídeos eliminassem a iniciação errônea em uma baixa concentração, quando modificados com um par de corantes silenciadores de Dabcila de interação, o oligômero 6-22 não responde à modificação: composição 6-22 DD, não um reagente de acordo com a presente invenção, era eficaz apenas em alta concentração (3000 nM). Os reagentes de acordo com a presente invenção têm hastes mais longas do que seis nucleotídeos e mais curtos do que catorze pares de base na maioria dos casos. Comprimentos mais curtos do que catorze pares de base são atualmente preferidos.

[056] A Tabela I mostra também a eficácia de outras modificações que aumentam a resistência de ligação à extremidade da haste. A adição de um par de corantes silenciadores Black Hole™ interativos a haste do oligômero 9-5 produziu o reagente 9-5 BHQBHQ, do qual uma concentração de apenas 100 nM era requerida para proporcionar eliminação de produtos não específicos formados em virtude de erros de iniciação errônea e a presença apenas do produto da amplificação desejado específico. A substituição de dois 2'-O-metil ribonucleotídeos em cada extremidade do oligômero 9-5 produziu o reagente 9-5 2'OM⁴, para o qual uma concentração de apenas 50 nM era requerida.

[057] A Tabela I mostra que o comprimento da alça de oligonucleotídeo pode ser variado consideravelmente. Comprimentos de alças de três nucleotídeos (reagente 9-3 DD), cinco nucleotídeos (reagente 9-5 DD) e vinte e dois

nucleotídeos (reagente 9-22 DD) resultaram todos em reagentes de acordo com a presente invenção que impediram a iniciação errônea em concentrações de 100 nM ou menos. Ao mesmo tempo, a Tabela I mostra que algum ajuste de tentativa e erro é necessário para otimização. Se um par de 2'-O-metil ribonucleotídeos é substituído pelos corantes silenciadores de Dabcila na modificação de estabilização do oligômero 9-5 (comparação do reagente 9-3 2'OM⁴ com o reagente 9-3 DD), o nível de eficácia é inalterado: uma concentração de apenas 50 nM é requerida. Contudo, fazendo a mesma mudança no oligômero 9-3 modificado (comparação do reagente 9-3 2'OM⁴ com o reagente 9-3 DD), o nível de eficácia, embora ainda bom, era diminuído: uma concentração de 300 nM era requerida, ao invés de uma concentração de 50 nM. Esses mesmos dados mostram que aumento do comprimento de alça do reagente 9-3 2'OM⁴ para criar o reagente 9-5 2'OM⁴ melhorou a eficácia: uma concentração de apenas 50 nM era requerida, ao invés de uma concentração de 300 nM. Reagentes candidatos podem ser rotineiramente avaliados e ajustados com o auxílio de um ensaio rigoroso, tal como aquele descrito no Exemplo 1.

[058] A Tabela I também mostra que compostos compreendidos de dois oligonucleotídeo complementares mantidos juntos em polaridade oposta por uma ligação em ponte não-nucleotídica (alça) também são ativos quando as extremidades livres 3' e 5' dos oligonucleotídeos são modificadas de acordo com a presente invenção (nas modalidades testadas por porções Dabcila). A Tabela 1 mostra que o tamanho de uma ligação em ponte não-nucleotídica não é crítica. As ligações em ponte descritas

na Tabela I são ligantes químicos compreendidos de cadeias lineares de 3-6 átomos de carbono, mas muitas outras variações sobre ligações em ponte não-nucleotídicas (alças) poderiam ser construídas por aqueles habilitados na técnica. Os dados na Tabela I sugerem que uma ligação em ponte de uma cadeia com 3 átomos de carbono é menor do que uma de uma cadeia com 6 átomos de carbono para a mesma haste de oligonucleotídeo (ativo em uma menor concentração) e, embora não rigorosamente testado, nós teorizamos que essa diferença reflete a flexibilidade nativa das ligações em ponte e seu conseqüente efeito ou capacidade de estimular ou diminuir a temperatura de fusão da haste. Nós utilizamos ligantes quimicamente neutros (não carregados), os quais nós preferimos.

[059] Diferentes aplicações dos reagentes e métodos de acordo com a presente invenção são exemplificadas nos Exemplos 2-4 abaixo. O Exemplo 2 descreve a utilização do reagente 9-22 DD em um ensaio de LATE-PCR que é um ensaio em tempo real, mas é mostrado como sendo adequado para um ensaio de ponto de término (*end-point*) também. O ensaio do Exemplo 2 utiliza uma técnica de detecção que é o assunto de nosso pedido de patente Provisório dos Estados Unidos simultaneamente depositado no. 60/619.654 intitulado *Primers, Probes and Methods for Nucleic Acid Amplification*, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade. Essa técnica de detecção inclui adição de um corante de DNA fluorescente, tal como SYBR Gold, o qual fluoresce quando ligado ao DNA fita dupla, e uma sonda de hibridização fluoroforo-rotulada complementar ao amplicon fita simples produzido em uma amplificação por LATE-PCR após exaustão do

Primer Limitado, onde o fluoroforo é estimulada pela emissão do corante; estimulação do corante; detecção de emissões do corante e do fluoroforo; e cálculo da proporção do sinal de fluoroforo para o sinal do corante. O Exemplo 2, assim, mostra a compatibilidade de reagentes de acordo com a presente invenção com sondas fluorescentes e corantes fluorescentes e a prevenção eficaz de iniciação errônea quando usados com um ou ambos.

[060] O Exemplo 4 descreve várias amplificações por LATE-PCR multiplex utilizando dois, três, quatro e mesmo cinco pares de primer e mostra a amplificação dos amplicons corretor em todos os casos quando reagente 9-3 DD foi adicionado à mistura de reação. Embora os produtos amplificados fossem analisados através de eletroforese em gel para fins do Exemplo 4, o método multiplex é também aplicável a ensaios multiplex, incluindo ensaios qualitativos e quantitativos, tais como ensaios em tempo real, empregando outros meios de detecção, tais como sondas de hibridização fluorescentes, para amplicons pretendidos. Para ensaios de LATE-PCR em tempo real, nós preferimos utilizar uma etapa de detecção em baixa temperatura após a etapa de extensão de primer e sondas de baixa temperatura conforme ilustrado, por exemplo, no Exemplo 3.

[061] O Exemplo 13 ilustra que reações de amplificação com misturas de reação de amplificação contendo mais de uma versão dos reagentes de acordo com a presente invenção também podem ser utilizadas. Por exemplo, uma mistura de amplificação pode conter um composto da presente invenção com uma temperatura de fusão elevada e outro composto da presente invenção com uma temperatura de fusão baixa, cada

um adicionado em sua própria concentração otimizada. A haste do composto 9-22DD com uma T_m calculada de 81 °C está na conformação fechada no início da reação e logo após a temperatura diminuir durante cada ciclo térmico, enquanto que o composto 12-3DD com uma T_m calculada de 58 °C está fechado apenas em temperaturas relativamente baixas. Portanto, ele atua como uma "partida a quente" para impedir iniciação errônea quando a mistura de reação está sendo preparada em temperatura ambiente, mas durante os subseqüentes ciclos térmicos de uma amplificação por PCR tendo uma temperatura de anelamento de 60 °C ou maior, não se fecha e se liga à polimerase. Misturas de reagentes são particularmente úteis para construção de reações multiplex nas quais pares múltiplos de primers abrangendo uma faixa de temperaturas de anelamento são combinados para amplificação de amplicons múltiplos. A mistura de reagentes usada no Exemplo 13 é melhor do que um único reagente apenas.

[062] O Exemplo 3 descreve uma amplificação por LATE-PCR utilizando reagente 9-3 DD para preparar o produto fita simples amplificado que é suficiente em quantidade e suficientemente isento de produtos não específicos originários de iniciação errônea e sendo adequado para uso como um material de iniciação para seqüenciamento. A amplificação foi prolongada para setenta ciclos para assegurar material de iniciação suficiente. Nós descobrimos que alguns amplicons são mais propensos a erros de iniciação errônea do Tipo 2 e do Tipo 3 do que outros amplicons. Em amplificações onde tal iniciação errônea é mais provável, nós preferimos que a haste do reagente de

acordo com a presente invenção se fecha quando a temperatura de ciclização cai da etapa de fusão de fita para a etapa de anelamento de primer. Isso pode ser assegurado através de ajuste da T_m da haste, da temperatura de anelamento ou ambos. Em um trabalho relacionado, nós descobrimos que a diluição de produto é um método simples para uso com seqüenciamento, conforme divulgado em nosso pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos simultaneamente depositado identificado acima.

[063] Nós investigamos o funcionamento e eficácia de modalidades de reagentes da presente invenção quando comparado com oligômeros que formam "hairpin" de DNA não modificado e uns com os outros. Nós projetamos um ensaio de polimerização de DNA para determinar a extensão de um primer rotulado por Taq DNA polimerase na presença de um reagente de teste. O ensaio utiliza primers que são rotulados com fluoróforos que são excitados pela emissão de um corante fluorescente, conforme divulgado em nosso pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos simultaneamente depositado identificado acima. A mistura de ensaio compreende uma concentração de 0,5 μ M de modelo de DNA de oligonucleotídeo sintético, uma concentração de 1,5 μ M de um primer de DNA complementar à extremidade 3' do modelo e rotulado com Cy5 em sua extremidade 5', tampão de PCR, $MgCl_2$, Taq DNA polimerase, uma diluição a 1:40.000 de corante de DNA fluorescente SYBR Green e o reagente de teste. Início controlado de reação é obtido através da adição de dNTP's. A reação é isotérmica: ela se processa em uma temperatura prescrita durante uma quantidade prescrita de tempo. Para avaliação do efeito do composto de teste

sobre a atividade de 5'-3' exonuclease da DNA polimerase, nós adicionamos à mistura de reação um "bloqueador", isto é, um oligonucleotídeo que é complementar à extremidade 5' do modelo, que é bloqueado em sua extremidade 3' com um fosfato e que é rotulado com ROX em sua extremidade 5'. Para avaliação do efeito do composto de teste sobre a atividade de polimerização da DNA polimerase, o bloqueador não é usado. Para facilitar análise dos produtos de reação através de análise de curva de fusão, o modelo, primer e bloqueador são projetados de modo que os seguintes híbridos sejam prontamente distinguíveis por suas temperaturas de fusão: primer-modelo, bloqueador-modelo, produto da extensão de comprimento total-modelo e produto da extensão parcial (até o bloqueador)-modelo. Análise em tempo real é obtida periodicamente excitando o corante e periodicamente monitorando a emissão de fluorescência do corante e de dois fluoróforos, ambos os quais são excitados indiretamente pela emissão do corante. Aumento na fluorescência do SYBR Green I indica polimerização. Diminuição na fluorescência do ROX indica degradação do bloqueador. Análise de ponto de término (*end-point*) é obtida parando a reação através da adição de EDTA a 12 mM, ajustando a diluição de SYBR Green I para 1:14.200 e ajustando a concentração do composto de teste para 800 nM; e, então, realizando uma análise de curva de fusão padrão, ao mesmo tempo em que se estimula o corante e monitora a fluorescência de cada um dos dois fluoróforos.

[064] Nós avaliamos os compostos 9-22, 9-22 DD e 9-3 DD com incubações a 55 °C durante 60 minutos. Nós também incluímos um controle sem composto de teste. Os resultados

do controle incubado com bloqueador presente, mas sem composto de teste indicam que a Taq DNA polimerase estendeu o primer através da região do bloqueador, embora não completamente sob essas condições, produzindo um produto com aproximadamente um único pico de fusão de acordo com fluorescência de Cy5. Assim, a enzima exibiu atividade de polimerização e atividade de 5'-3' exonuclease. Os resultados com composto 9-22 DD presente em uma concentração de 300 nM ou uma concentração de 1000 nM mostraram a produção de produto da extensão parcial e um efeito sobre a quantidade de bloqueador residual de uma maneira dose-dependente. Assim, o composto 9-22 DD inibiu a atividade de 5'-3' exonuclease da polimerase a 55 °C. Houve uma diminuição na produção de produto de comprimento total, particularmente na concentração de 1000 nM, sugerindo que na concentração elevada o composto 9-22 DD começa a inibir a polimerização.

[065] Outro ensaio que nós utilizamos para investigar as propriedades dos reagentes de acordo com a presente invenção é descrito abaixo no Exemplo 6. Esse ensaio detecta a capacidade de um reagente de teste de inibir a extensão pela Taq DNA polimerase a 25 °C. Os resultados reportados no Exemplo 7 mostram que, enquanto que os oligonucleotídeos de "hairpin" não modificados 9-22 e 9-3 não tinham efeito com relação a um controle, os reagentes 9-22 DD e 9-3 DD inibiram a extensão de primer de uma maneira dose-dependente. Assim, mesmo em uma temperatura suficientemente baixa para que os reagentes de acordo com a presente invenção inibam a atividade de polimerização em baixas concentrações, seus análogos não modificados não

tinham essa propriedade nas mesmas condições.

[066] Nós utilizamos dois ensaios para investigar o efeito inibitório de reagentes de acordo com a presente invenção sobre a atividade de 5'-para-3' exonuclease da DNA polimerase. Um ensaio é descrito no Exemplo 7. O ensaio mede a inibição de atividade de 5'-para-3' exonuclease durante ciclização térmica. A FIG. 7 mostra que o reagente 9-22 DD inibe essa atividade de exonuclease de uma maneira dose-dependente em concentrações oscilando de 50 nM a 300 nM.

[067] O segundo ensaio é descrito abaixo no Exemplo 9. Ele mede quantitativamente a inibição de atividade de 5'-para-3' exonuclease a 25 °C. A FIG. 9 mostra a inibição dose-dependente pelo reagente 9-22 DD em concentrações de 50 nM a 1000 nM.

[068] Ainda outro ensaio descrito abaixo no Exemplo 6 mede a inibição de reagente da extensão de primer realizada pelo Fragmento de Stoffel da Taq DNA polimerase. Conforme é o caso com a Taq polimerase intacta, inibição de extensão requeria a presença de extremidades modificadas sobre as hastes de oligonucleotídeo e não foi significativamente afetada pelo comprimento da alça entre a haste. Contudo, diferente do caso da Taq polimerase intacta, o Fragmento de Stoffel é inibido pelo composto 6-22DD, um reagente tendo uma haste de apenas seis nucleotídeos. Nós concluimos que o Fragmento de Stoffel não interage com o reagente da mesma maneira que a polimerase intacta.

[069] Os reagentes de acordo com a presente invenção são úteis para prevenção de iniciação errônea em ensaios de PCR simétricos, conforme demonstrado abaixo no Exemplo 8. O ensaio mediu a amplificação de uma sequência do gene da

fibrose cística usando um par equimolar de primers tendo valores de T_m muito similares.

[070] Amplificações por PCR e ensaios atualmente em uso incluem, tipicamente, o preparo de misturas de reação de amplificação em temperatura ambiente, assim, requerendo a inclusão de reagentes de acordo com a presente invenção na mistura inicial para inibir iniciação errônea do Tipo 1. Contudo, essa necessidade não será o caso. Determinados métodos automáticos, por exemplo, métodos microfluídicos, permitem a adição de polimerase a uma mistura de reação em temperatura elevada para uma partida a quente, desse modo, ultrapassando a iniciação errônea do Tipo 1. Com tais métodos, os reagentes de acordo com a presente invenção poderiam ser adicionados após o início de amplificação.

[071] A formação de primer-dímero é uma manifestação de iniciação errônea que pode ocorrer em reações completas, isto é, aquelas contendo todos os componentes requeridos para amplificação mais uma sequência alvo inicial, bem como em reações que não contêm uma sequência alvo. Primer-dímeros são, tipicamente, sequências de DNA fita dupla curtas formadas pela iniciação errônea de um ou mais primers em uma reação através de hibridização a e extensão junto com outra cópia do mesmo primer fita simples ou algum outro primer presente na reação. A formação de primer-dímero na presença de uma sequência alvo é observada como um acúmulo do primer-dímero sem acúmulo de um amplicon específico. Primer-dímeros podem também formar oligômeros que têm a sequência mais longa do que o primer-dímero básico porque eles contêm cópias concatenadas adicionais de um ou ambos os primers. O processo de oligomerização não é

bem compreendido, mas é facilmente detectado através de eletroforese em gel ou análise de ponto de fusão dos produtos da reação. Em virtude da formação de primer-dímero, a quantidade do amplicon esperado produzido durante um determinado número de ciclos térmicos é reduzida à medida que um ou ambos os primers são consumidos na geração e acúmulo de primer-dímeros. Eliminação de primer-dímeros, portanto, é desejável porque ela aumenta a especificidade e rendimento do produto correto. Essas características de primer-dímeros, bem como sua eliminação através da adição dos reagentes descritos na presente invenção, são ilustradas no Exemplo 10.

[072] A probabilidade de formação de primer-dímero é aumentada pela homologia de sequência entre a extremidade 3' de um primer e seqüências internas ao mesmo primers ou um primer diferentes, além de muitos outros fatores, por exemplo, elevação da concentração de primer, aumento da concentração de magnésio, aumento do comprimento do primer, diminuição da temperatura de anelamento do ciclo térmico e aumento do número total de primers incluídos na reação. Além disso, é bem sabido na técnica que a probabilidade de formação de primer-dímero é muito maior em reações empregando polimerases que não são de partida a quente quando comparado com aquelas empregando polimerases de partida a quente. Isso é porque a hibridização e extensão de primer-primer podem ocorrer em temperaturas relativamente baixas quando os componentes da reação estão sendo misturados. Enzimas de partida a quente reduzem, mas não eliminam totalmente, a geração e acúmulo de primer-dímeros. Essas características de primer-dímeros, bem como

sua eliminação via a adição dos reagentes descritos na presente invenção, são ilustradas no Exemplo 11.

[073] A formação de primer-dímeros também pode ter efeitos sutis sobre a cinética de uma reação e sua eliminação através da adição dos reagentes descritos aqui pode ser observada e otimizada cineticamente. O Exemplo 12 descreve uma amplificação por LATE-PCR compreendida de dois pares de primers e geração de dois produtos fita simples. O acúmulo cinético de um desses produtos foi detectado através de hibridização a uma sonda fluorescente e é mostrado na FIG. 13 e na FIG. 14. Os dados demonstram que a linearidade da cinética é afetada pela composição precisa da haste do reagente, em virtude de seu efeito sobre a temperatura de fusão, e pela concentração do reagente. Além disso, uso ótimo e subótimo de reagentes pode alterar a taxa de amplificação linear em uma LATE-PCR e, desse modo, a magnitude do sinal no final da reação sem afetar o valor de C_T da reação. A FIG. 15 e a FIG. 16 demonstram que a eficácia de amplificação era a mesma, conforme julgado pelos valores de C_T sobre uma faixa de concentrações iniciais do modelo quando composto 9-3DD foi usado a 150 e 300 nM, mas a magnitude dos sinais originários de números iniciais de 100 e 1000 modelos na presença de 9-3DD a 300 nM era maior do que aquela obtida usando 9-3DD a 150 nM, provavelmente em virtude da ausência de formação de primer-dímero.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Ensaio Rigoroso para Avaliação de Erros de Iniciação Errônea

[074] De forma a avaliar iniciação errônea do Tipo 1,

Tipo 2 e Tipo 3 em reações de amplificação por PCR, nós realizamos uma amplificação por LATE-PCR utilizando DNA genômico cisalhado e investigamos os produtos através de análise do ponto de fusão e através de eletroforese em gel. Uma amplificação particular que nós usamos é a seguinte:

A. Substrato: 10-10.000 equivalentes genômicos de DNA genômico cisalhado. O DNA foi comercialmente adquirido e processado através de congelamento e descongelamento do DNA genômico múltiplas vezes ou através de outro método similar conhecidos por aqueles habilitados na técnica para cisalhamento de DNA.

B. Base de Mistura para Amplificação por PCR (veja Sanchez e colaboradores (1994) PNAS 101: 1933-1938):

Substrato: 2000 genomas de DNA genômico cisalhado

Tampão de PCR 1X

Mg⁺²: a 3 milimolar (mM)

dNTPs: concentração de 250 micromolares (μM) de cada um dos quatro dNTP's

Primer em Excesso: sequência 5' CTTTGATGACGCTTCTGTATCTA 3' (SEQ ID NO: 13) a 1000 nanomolar (nM)

Primer Limitado: sequência 5' CCTGGATTATGCCTGGCACCAT 3' (SEQ ID NO: 14) a 50 nM

DNA polimerase: 1,25 unidades por 25 microlitros (μl) de mistura de reação

C. Protocolo de Amplificação:

Incubação em baixa temperatura: 35 min em temperatura ambiente

Protocolo de amplificação por PCR: embeber em alta temperatura a 95 °C durante 15 min; 10 ciclos 95 °C durante 10 seg, 55 °C durante 30 seg; e 70 °C durante

30 seg, seguido por 70 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 50 °C durante 30 seg e 70 °C durante 30 seg.

[075] Um caso de linha de base iniciação errônea foi estabelecido através de amplificações utilizando duas DNAs polimerases termoestáveis, Taq Promega e Tag Invitrogen, sem o uso de qualquer metodologia de partida a quente. Amplificações adicionais foram realizadas utilizando duas DNA polimerases de partida a quente comerciais, Taq Qiagen Hot Star e Taq Platinum (Invitrogen). Finalmente, amplificações adicionais foram realizadas com a adição de 300 nM de uma modalidade presentemente preferida de um reagente de acordo com a invenção. Uma modalidade usada nesse exemplo é um reagente que nós referimos como composição 9-22 DD (em nossa nomenclatura, "9" é o comprimento da haste, "22" é o comprimento da ALÇA e "DD" significa a modificação de estabilização, nesse caso, um par de corantes silenciadores Dabcila). O composto 9-22 DD tem uma T_m calculada de 81 °C. Ele tem a seqüência mostrada na Tabela II que é modificada pela adição de porções Dabcila 5' terminais e 3' terminais.

[076] Eletroforese em gel resultantes de várias amplificações, com coloração com brometo de etídio, são mostradas na FIG. 1, a qual inclui marcadores de tamanho (diferenças de 100 pares de base) nas colunas marginais não rotuladas. Duplicatas foram realizadas, de modo que existisse duas fileiras para o produto de cada amplificação por LATE-PCR: fileiras a, um caso de linha de base no qual o DNA foi omitido; fileiras b, um caso de linha de base no qual a DNA polimerase era Promega Taq; fileiras c, um caso de linha de base no qual a DNA polimerase era Taq

Invitrogen; fileiras d, substituição da enzima de partida a quente Taq Qiagen Hot Star; fileiras e, substituição da enzima de partida a quente Taq Platinum; fileiras f, amplificação utilizando Taq polimerase Promega com a adição de composto 9-22 DD; fileiras g, amplificação utilizando Taq polimerase Invitrogen e composto 9-22 DD; fileiras h, amplificação utilizando Taq DNA polimerase Qiagen Hot Star e composto 9-22 DD; fileiras i, amplificação utilizando Taq polimerase Platinum e composto 9-22 DD.

[077] A partir da FIG. 1 pode ser observado que Taq DNA polimerases regulares que têm atividade de polimerização e atividade de 5'-3' exonuclease (fileiras b e fileiras c) proporcionam uma faixa de tamanhos de produtos, quase nenhum dos quais era o amplicon desejado definido pelo par de primer, o qual é o produto observado nas fileiras f-i. Trocar para as polimerases de "partida a quente" modificadas (fileiras d-e) ajudou, mas ainda não eliminou produtos não específicos formados em virtude de erros de iniciação errônea. Quando composto 9-22 DD estava presente em uma concentração de 300 nM, contudo, o amplicon desejado foi obtido sem produtos não específicos formados em virtude de erros de iniciação errônea quando a enzima era uma Taq DNA polimerase regular (fileiras f-g) e quando a enzima era uma Taq DNA polimerase de partida a quente (fileiras h-i).

[078] Usando o ensaio rigoroso desse exemplo, nós comparamos uma série de moléculas de "hairpin" de DNA modificadas e não modificadas sem estabilização terminal; com desestabilização terminal conforme uma obtida através da adição de nucleotídeos idênticos à extremidade de cada

braço; com estabilização terminal de acordo com a presente invenção; e com adições terminais de não-estabilização. Para fazer a comparação quantitativa, nós realizamos testes de resposta à dosagem usando o ensaio para cada composto que exibia atividade de supressão da iniciação errônea de forma a determinar a concentração mínima necessária para proporcionar eliminação de produtos não específicos formados em virtude de erros de iniciação errônea e na presença apenas do produto específico desejado, obtido conforme mostrado na FIG. 1, com Taq DNA polimerase regular. Os resultados são mostrados na Tabela I, a qual inclui a T_m calculada da haste para cada reagente testado. Sequências dos vários compostos reportados na Tabela I são apresentadas na Tabela II.

TABELA I

12-C3DD	Espaçador C3 5'3' dabcila	12/56	3	Sim	300
12- C3C3DD	Espaçador C3 5'3' dabcila	12/56	3	Sim	300
9-22-3D	3' dabcila	9/81	22	Sim	1000
9-22-5D	5' dabcila	9/81	22	Não	
9-22FF	5'3' dabcila	9/81	22	Não	
9-22AA	5'3' AA	9/85	22	Não	
9-22TT	5'3' TT	9/78	22	Não	
9-22TT 5D	5'3' TT com 5' dabcila	9/78	22	Não	
6-22DD	5'3' dabcila	6/80	22	Sim	3000
9-3DD	5'3' dabcila	9/56	3	Sim	100
9-3bDD	5'3' dabcila	9/62	3	Sim	100
9-3iDD	5'3' dabcila	9/68	3	Sim	100
9-5DD	5'3' dabcila	9/93	5	Sim	50
9-22DD	5'3' dabcila	9/81	22	Sim	50
9-5 BHQBHQ	5'3' Black Hole Quencher™	9/93	5	Sim	100
9-3 2'OM ⁴	5'3' Black Hole Quencher™	9/93	3	Sim	300
9-5 2'OM ⁴	5'3' Black Hole Quencher™	9/93	5	Sim	50
12-3DD	5'3' dabcila	12/58	3	Sim	50
12-3bDD	5'3' dabcila	12/63	3	Sim	100
12-3cDD	5'3' dabcila	12/68	3	Sim	100

TABELA II

Composto	Sequência	SEQ ID NO:
6-22	GGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCC	1
9-3	CATTATAATGAAATTATAATG	2

9-5	CGCGGCGTCATATAGACGCCGCG	3
9-22	CGCGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCCGCG	4
11-22	GCTCGCTGCCGACCGTATATCCTATGGCCCTGACGGCAGCGAGC	5
12-3	CTTAATTATAATGAAATTATAATTAAG	6
12-C3	CTTAATTATAAT-(CH ₂) ₃ -ATTATAATTAAG	7
12-C3C3	CTTAATTATAAT-(CH ₂) ₃ -ATTATAATTAAG	8
9-3b	CGTTATAATGAAATTATAACG	9
9-3i	CGCTATAATGAAATTATAGCG	10
12-3bDD	CGTAATTATAATGAAATTATAATTACG	11
12-3cDD	CGCTATTATAATGAAATTATAATAGCG	12

[079] A Tabela I compara vários "hairpins" de DNA, com e sem modificações e identifica várias moléculas de "hairpin" terminalmente estabilizadas que são reagentes de acordo com a presente invenção (amplicon limpo sem produtos de iniciação errônea em uma concentração de pelo menos 1000 nM) ou que são reagentes preferidos de acordo com a presente invenção (amplicon limpo sem produtos de iniciação errônea em uma concentração de não mais do que 650 nM). Os "hairpins" não modificados são identificados por dois números, o primeiro sendo o comprimento da haste e o segundo sendo o comprimento da alça. Compostos de acordo com a presente invenção que aparecem na Tabela I têm várias modificações de estabilização: um corante silenciador de Dabcila 5' e um corante silenciador de Dabcila 3' covalentemente presos aos nucleotídeos terminais por meio de um ligante comercial (indicado pelo sufixo "DD"), um corante silenciador Black Hole™ 3' e um corante silenciador Black Hole™ 5' similarmente presos (indicados pelo sufixo "BHQ") e dois 2'-O-metil ribonucleotídeos 3'

e dois 2'-O-metil ribonucleotídeos 5' substituídos por deóxiribonucleotídeos no término da haste (indicado por "2'OM⁴"). Modificações de desestabilização nos términos da haste incluíam substituição de um par de A's ou T's nas extremidades 3' e 5' da molécula. Adição de um par de fluoroforos FAM, os quais não acredita-se que interajam um com o outro de um modo para haste-estabilização, foi desestabilizado, assim como a adição de uma única Dabcila 5'. Contudo, a adição de uma única Dabcila 3' estabilizou ligeiramente o "hairpin" 9-22, conforme mostrado por uma queda na concentração requerida. A "hairpin" 9-22 suprimiu a iniciação errônea apenas em uma concentração elevada (3000 nM), mas 9-22 DD assim o faz em uma baixa concentração (50 nM).

[080] Outro de nossos "hairpins" presentemente preferidos, composto 9-3, suprimiu a iniciação errônea apenas em uma concentração elevada (1000 nM), mas 9-3 DD e 9-3 2'OM⁴ assim o fazem em uma concentração menor (100-300 nM). Ainda outra modalidade, 9-5 DD, 9-5 BHQBHQ e 9-5 2'OM⁴ também assim o fazem em baixas concentrações (50-100 nM). O oligonucleotídeo 9-5 tem a mesma haste que o oligonucleotídeo 9-22, mas uma alça mais curto, cujos nucleotídeos são A's e T's. A T_m calculada da haste do oligonucleotídeo 9-5 é de 93 °C, quase que 12 °C maior do que a T_m calculada da haste do oligonucleotídeo 9-22 em virtude da influência das alças.

[081] Resultados similares foram obtidos com uma haste ainda mais longo. O composto 12-3 não suprime a iniciação errônea, mas o composto 12-3DD era eficaz em uma concentração de apenas 50 nM.

[082] A Tabela I mostra que hastes estabilizados podem ser modificados para alterar a temperatura de fusão (T_m) calculada da haste. Por exemplo, o composto 9-3DD, T_m de 56 °C, era eficaz em uma concentração de 100 nM. Alterando o teor de G-C da haste, nós criamos os compostos 9-3bDD (T_m de 62 °C) e 9-3iDD (T_m de 68 °C). Ambos também eram eficazes em uma concentração de 100 nM. O composto 12-3DD, T_m de 58 °C, era eficaz em uma concentração de 50 nM. Compostos com hastes alteradas, isto é, composto 12-3bDD, T_m de 63 °C, e composto 12-3cDD, T_m de 68 °C, eram eficazes em uma concentração de 100 nM, ainda muito bom.

Exemplo 2. Ensaio de ponto de término (*End-Point*) por LATE-PCR

[083] Variação estocástica na cinética de reação entre amostras repetidas resulta em dispersão de sinais de sondas de hibridização e impede análise de ponto de término (*end-point*). LATE-PCR reduz significativamente esse problema. A utilização de um reagente de acordo com a presente invenção melhora adicionalmente a capacidade de utilizar detecção de ponto de término (*end-point*). A FIG. 2 apresenta os resultados obtidos em amplificação de um amplicons que inclui o alelo G269 do gene de hexosaminidase A responsável pela doença de Tay Sachs. A mistura de reação continha sonda de hibridização a 0,6 μ M e 1000 genomas de DNA alvo homozigótico do tipo silvestre (+/+) ou DNA alvo heterozigótico (G269/+). Amostras repetidas de cada tipo foram analisadas como segue: tampão de PCR 1x, MgCl₂ a 3 mM, cada dNTP a 250 μ M, Primer Limitado a 25 nM tendo uma sequência 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (SEQ ID NO: 15), Primer em Excesso a 1000 nM tendo uma sequência 5'

TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ ID NO: 16), 1,25 unidades de Taq polimerase Platinum (partida a quente), sonda de hibridização Cy5-rotulada a 0,6 μ M tendo uma seqüência 5' Cy5- GGGACCAGGTAAGAA - fosfato 3' (SEQ ID NO: 17) e uma diluição a 1:40.000 de SYBR Gold I na presença ou ausência de 100 nM de modalidade 9-22 DD em reações de 25 μ l. Os parâmetros do ciclo de PCR eram 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg e 72 °C durante 20 seg; e 30 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 segundos e 45 °C durante 20 seg com aquisição de fluorescência a 72 °C para SYBR Gold e aquisição de fluorescência a 55 °C e 45 °C para Cy5. Para corrigir as variações tubo-a-tubo na cinética de reação, os sinais de hibridização foram normalizados pela proporção de sinais de Cy5 a 55 °C para sinais de SYBR Gold a 72 °C. Uma consequência de tal normalização é que o retardo de C_T é disfarçado.

[084] A FIG. 2, linhas identificadas pelo círculo 21 e linhas identificadas pelo círculo 22, mostra os resultados de réplicas múltiplas sem a adição de um reagente de acordo com a presente invenção, mas com polimerase de partida a quente. Réplicas homozigóticas (círculo 21) e réplicas heterozigóticas (círculo 22) podem ser distinguidas pelos declínios de suas plotagens lineares. A dispersão entre as réplicas e erros de iniciação errônea nessas amostras, evidenciados pela queda no sinal de sonda de hibridização (o "efeito de gancho") após cerca de 40 ciclos, exclui identificação de ponto de término (*end-point*) dessas amostras. A FIG. 2, linhas identificadas pelos círculos 23-

24, mostra os resultados com adição de reagente de acordo com a presente invenção, isto é, 9-22 DD a 100 nM. Sob essas condições, erros de iniciação errônea não ocorrem, a cinética linear é preservada no curso do ensaio, a dispersão é reduzida, o efeito de gancho é evitado e identificação de ponto de término (*end-point*) de amostras homozigóticas e heterozigóticas é possível a 50 ciclos.

Exemplo 3. Preparo de Amostras de DNA para Sequenciamento de Dideoxi

[085] LATE-PCR é um método de amplificação não-simétrico que gera potencialmente grandes quantidades de DNA fita simples adequado para sequenciamento de DNA quando a reação de amplificação é realizada durante 60 e mais ciclos térmicos. Contudo, tais números grandes de ciclos de amplificação encorajam o aparecimento de produtos de iniciação errônea, acredita-se que incluindo a formação de erros de iniciação errônea do Tipo 2 e Tipo 3, que se manifestam pelo acúmulo de produtos não específicos detectáveis que eventualmente se tornam as espécies predominantes na reação. Os reagentes de acordo com a presente invenção permitem a síntese de grandes quantidades de DNA fita simples adequado para sequenciamento de DNA na ausência de produtos não específicos quando usando 70 e mais ciclos de amplificação por LATE-PCR. Amostras adequadas para sequenciamento de dideoxi através de eletroforese em gel capilar foram preparadas como segue. A mistura de reação de LATE-PCR foi primeiro preparada em 25 μ l contendo 1X tampão de PCR, $MgCl_2$ a 3 mM, Primer em Excesso a 1000 nM tendo a sequência 5'

GCCAGGGGTTCCACTACGTAGA 3' (SEQ ID NO: 18), Primer Limitado tendo a sequência 5' CCGCCCTTCTCTCTGCCCCCTGGT 3' (SEQ ID NO: 19), 1,25 unidades de Taq polimerase Platinum, reagente 9-3 DD a 600 nM e cada dNTP a 250 μ M. Composto 9-3 DD tem um corante silenciador de Dabcila adicionado a cada nucleotídeo terminal do oligonucleotídeo 9-3. Amplificação foi realizada a 95 °C durante 3 minutos; 10 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg e 72 °C durante 20 seg; e 60 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg; e 45 °C durante 20 seg. Reações paralelas foram realizados com: uma diluição a 1:40.000 de SYBR Green ou um sinalizador molecular com baixa T_m a 2,4 μ M tendo a sequência 5' FAM-CGTGCGCTCTGGTAAGGGTTTGCACG-Dabcila 3' (SEQ ID NO: 20) para monitorar a síntese de DNA fita dupla e fita simples separadamente. Cada amostra continua 6 ng (cerca de 1000 genomas) de DNA humano. Ainda, um controle foi realizado sem a adição de composto 9-3 DD.

[086] Os resultados das reações de amplificação foram que o controle com Taq DNA polimerase de partida a quente, mas não composto 9-3 DD, manifesta iniciação errônea significativa, conforme evidenciado por uma elevação secundária no sinal do SYBR Green durante os últimos estágios de amplificação, após o Primer Limitado ter sido eliminado. Em virtude do produto ser tal mistura, não foi possível seqüenciar o controle. Por outro lado, resultados da amplificação com composto 9-3 DD adicionado mostraram a presença apenas do produto específico desejado sem uma elevação retardada no sinal do SYBR Green no decorrer de 70 ciclos. Nós calculamos, a partir da concentração de Primer Limitado e uma eficácia presumida de amplificação linear de

50%, que a reação gerou 250 fmoles/ μ l de produto limpo. Esse produto foi enviado à unidade de seqüenciamento de dideóxi da Brandeis University para seqüenciamento.

[087] A reação de seqüenciamento foi realizada usando um protocolo padrão, assim como a eletroforese capilar utilizando um Seqüenciador de DNA Beckman CEQ 2000. A reação de seqüenciamento foi realizada com uma alíquota de 1/5 do produto amplificado, isto é, com apenas 50 fmoles de produto. A seqüência produzida na máquina é apresentada na FIG. 3 (referente à SEQ ID NO: 50), a qual mostra a seqüência ao longo da parte superior do gráfico, os picos de produto claro não ambíguos a partir dos quais a seqüência foi derivada e, na parte inferior, um nível muito baixo de sinal de base. Nós confirmamos a exatidão da seqüência produzida na máquina comparando-a com a seqüência conhecida do amplicon disponível do No. de Acesso ao GenBank NT 010235.

Exemplo 4. Amplificação por PCR Multiplex

[088] A supressão de erros de iniciação errônea é particularmente crítica em reações multiplex onde produtos múltiplos são simultaneamente amplificados. A presença de vários pares de primer e produtos de amplificação aumenta a probabilidade de interações de iniciação errônea entre e dentre essas espécies reativas. Reações multiplex compostas de números crescentes de amplicons foram realizadas na ausência ou presença de composto 9-3 DD. Reações de LATE-PCR, volume de 25 μ l, consistindo de amostra, 1X tampão de PCR, $MgCl_2$ a 3 mM, cada dNTP a 100 μ M, Primer em Excesso a 1000 nM, Primer Limitado a 50 nM e 1,25 unidades de Promega Taq polimerase que não é de partida a quente foram ajustados na ausência ou presença de reagente 9-3 DD a 300

nM para diferentes combinações de pares de primer, conforme indicado abaixo. As amostras foram amplificadas usando um perfil de ciclicização térmica de 95 °C durante 3 minutos; 10 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 30 seg e 70 °C durante 30 seg; e 40 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 50 °C durante 30 seg, 70 °C durante 30 seg. Ao final da reação, as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3,5% em 0,5 x TBE. Os amplicons pretendidos e pares de primers testados eram como segue:

[089] Reação A: duas regiões TSD 1278 + TSD 1421 do gene de Hex-A associado à doença de Tay Sachs.

Primer em Excesso TSD 1278: 5' GCCAGGGGTTCCTACTACGTAGA
3' (SEQ ID NO: 21)

Primer Limitado TSD 1278: 5' CCGCCCTTCTCTCTGCCCCCTGGT
3' (SEQ ID NO: 22)

Primer em Excesso TSD 1421: 5' CCGGGTCTCTAAGGGAGAACTCCT
3' (SEQ ID NO: 23)

Primer Limitado TSD: 5' CCGGCCGACAACACAAACCTGGTCC 3'
(SEQ ID NO: 24)

[090] Reação B: amplicon TSD 1278, amplicon TSD 1421 e uma região do gene CFTR, o amplicon 10 com éxon CF.

[091] Essa reação continha os mesmos pares de primer em Reação A mais

Primer em Excesso CF ex 10: 5' GCTTTGATGACGCTTCTGTATCTA
3' (SEQ ID NO: 25)

Primer Limitado CF ex 10: 5' CAGTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACCAT
3' (SEQ ID NO: 26)

[092] Reação C: amplicon TSD 1278, amplicon TSD 1421, amplicons 10 com éxon CF e outra região do gene CFTR, o amplicons 11 do éxon CF. Essa reação continha os mesmos

pares de primers em Reação B mais

Primer em Excesso CF ex 11: 5' TCGAAGTTTGCAGAGAAAGACAAT
3' (SEQ ID NO: 27)

Primer Limitado CF ex 11: 5' TGACGTTTACAGCGAATGCTTGCTAGACCAAT
3' SEQ ID NO: 28)

[093] Reação D: amplicons TSD 1278, amplicon TSD 1421, amplicons 10 do éxon CF, amplicons CF ex 11 e uma região do gene da beta globina humana. Essa reação continha os mesmos pares de primers em Reação C mais

Primer em Excesso de Beta Globina: 5'
TGGGTTTCTGATACGCACTGACTCTCTC 3' (SEQ ID NO: 29)

Primer Limitado de Beta Globina: 5'
GGCCATCACTAAAGGCACCGAGCACT 3' (SEQ ID NO: 30)

[094] Os géis de eletroforese foram corados com brometo de etídio para detectar produtos fita dupla produzidos durante a fase exponencial da reação de LATE-PCR. A FIG. 4 mostra porções pertinentes dos géis de produtos de reações multiplex A a D. As setas apontam para produtos de amplificação fita dupla específicos, as bandas não enumeradas correspondem a produtos de DNA fita simples específicos com estruturas secundárias e asterisco identifica produtos não específicos. Pares de gel A-D correspondem às reações A-D, respectivamente. Cada gel rotulado "+" é produto da amplificação incluindo composto 9-3 DD. Cada gel rotulado "-" é produto da amplificação sem composto 9-3 DD.

[095] O par de gel A mostra que, na ausência de composto 9-3 DD, a região TSD 1278 (seta 41) não amplifica, mas a região TSD 1421 (seta 42) amplifica, junto com um grande número de produtos não específicos, predominante ou

totalmente fita dupla, que aparecem no gel como um esfregaço. A adição do composto 9-3 DD reduziu a base de produtos não específicos e permitiu amplificação de TSD 1278 (seta 41) e TSD 1421 (seta 42) de modo mais limpo, mostrando que várias manifestações de iniciação errônea foram impedidas.

[096] O par de gel B mostra que, na ausência de composto 9-3 DD, as regiões TSD 1278, TSD 1421 e éxon 10 CF (seta 43) amplificaram junto com um grande número de produtos não específicos que aparecem no gel como um esfregaço. A adição do composto 9-3 DD eliminou a base de produtos não específicos e todos os três amplicons esperados foram obtidos.

[097] O par de gel C mostra que, na ausência de composto 9-3 DD, as regiões TSD 1278, TSD 1421, éxon 10 CF e éxon 11 CF (seta 44) amplificaram junto com um produto não específico indicado pelo asterisco. A adição do composto 9-3 DD eliminou a síntese de produto não específico e todos os quatro amplicons esperados foram obtidos.

[098] O par de gel D mostra que, na ausência de composto 9-3 DD, a região selecionada do gene de beta globina (seta 45) não amplifica, mas TSD 1278, TSD 1421, éxon 10 CF e éxon 11 CF amplificam, junto um produto não específico indicado pelo asterisco. A adição do composto 9-3 DD eliminou a síntese de produto não específico e permitiu a amplificação de todos os cinco amplicons esperados.

[099] Nós também demonstramos o uso de um composto de acordo com a presente invenção em amplificação multiplex e

reações de detecção quando apenas um alvo está presente em qualquer dada amostra de teste, tal como pode ocorrer quando de seleção por um patógeno infeccioso. Em tal caso, pares múltiplos de primers (nós utilizamos pares múltiplos de Primers em Excesso e Primers Limitados para amplificações por LATE-PCR) estão presentes, mas apenas um par de primer será ativo para uma amostra em particular. Conforme indicado pela fluorescência de SYBR Green e análise eletroforética pós-amplificação, isso, na verdade, ocorreu, demonstrando que os compostos da presente invenção inibem eficazmente a iniciação errônea em reações multiplex quando menos do que todos os substratos estão presentes.

Exemplo 5. Relação Entre a T_m da Haste e a Temperatura de Anelamento

[100] Dois protocolos de amplificação por LATE-PCR diferentes foram comparados utilizando a mesma mistura de amplificação, incluindo alvo. Cada amplificação foi realizada com composto 9-3 DD a 600 nM e sem composto 9-3 DD. Conforme indicado anteriormente, a T_m da haste do composto 9-3 DD (isto é, a temperatura de fusão calculada do oligonucleotídeo 9-3 não modificado) é de 56 °C. Taq DNA polimerase Platinum de partida a quente foi usada. As duas amplificações diferiam primariamente quanto à temperatura de anelamento de primer que foi empregada, 65 °C (acima da T_m da haste) ou 55 °C (abaixo da T_m da haste). Os parâmetros do ciclo de amplificação foram:

[101] Perfil A: 95 °C durante 3 minutos; dez ciclos de 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg; sessenta ciclos de 95 °C durante 15 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg, 50 °C durante 20 seg.

[102] Perfil B: mesmo que o perfil A, exceto que os últimos sessenta ciclos de 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg, 45 °C durante 20 seg.

[103] As reações de amplificação foram monitoradas em tempo real usando corante fluorescente SYBR Green I para monitorar a sintase de produto fita dupla, a qual nivela em uma reação de LATE-PCR após exaustão do Primer Limitado, a menos que iniciação errônea cause uma variação na porção final de uma amplificação. Leituras foram tomadas durante a etapa de detecção em baixa temperatura.

[104] Os resultados são apresentados na FIG. 5. O painel A mostra as leituras de fluorescência de amostras repetidas de Perfil A, quando a temperatura de anelamento de 55 °C foi utilizada após dez ciclos de extensão com (círculo 52) e sem (círculo 51) inclusão de composto 9-3 DD. O Painel B mostra as leituras de fluorescência de amostras repetidas de Perfil B, quando a temperatura de anelamento de 65 °C foi usada após dez ciclos de extensão, com (círculo 54) e sem (círculo 53) inclusão de composto 9-3 DD.

[105] A FIG. 5 mostra que, quando uma temperatura de anelamento de primer abaixo da T_m da haste do reagente da presente invenção foi usada (Painel A), um retardo de vários ciclos no ciclo de limiar, C_T , foi observado. Contudo, quando a temperatura de anelamento foi mantida significativamente acima da T_m da haste no decorrer da fase exponencial (Painel B), pouco, se houve, retardo de C_T foi observado. Foi notado que, para o amplicon utilizado nessa amplificação em particular, nenhuma iniciação errônea do Tipo 2/Tipo 3 foi observada, com ou sem composto 9-3 DD

quando Taq de partida a quente foi usada, mostrando a incapacidade de prever a ocorrência de tais erros de iniciação errônea. Esse exemplo demonstra que a haste do reagente 9-3 DD é fechado quando a temperatura da reação cai para 55 °C e que o reagente permanece ligado à polimerase durante a etapa de extensão em maior temperatura da reação.

Exemplo 6. Efeito sobre a Atividade de DNA Polimerase a 25 °C

[106] Uma série de experimentos de extensão de primer foi realizada a 25 °C para avaliar o efeito dos reagentes de acordo com a presente invenção e seus análogos de oligonucleotídeo não modificados. Cada mistura de reação incluía um modelo, um primer e uma Taq DNA polimerase. A reação foi realizada durante duas horas em cada caso. O primer foi fluorescentemente rotulado com Cy5. Corante fluorescente SYBR Green foi adicionado à mistura de reação. Após as reações de extensão, curvas de fusão foram feitas, nas quais o corante foi estimulado e emissão de fluoróforo em virtude de transferência de FRET do corante foi lida, conforme divulgado em nosso pedido de patente Provisório dos Estados Unidos concorrentemente depositado intitulado Primers, Probes and Methods for Nucleic Acid amplification. Os resultados são apresentados na FIG. 6.

[107] A FIG. 6, painel A, inclui a curva de fusão 61, obtida quando extensão foi excluída através de omissão de dntps da mistura de reação. A curva 61 é, assim, a curva de fusão do híbrido primer-alvo, mostrando uma T_m de 58 °C. O painel A também inclui vários controles os quais continham dNTPs, quer sozinhos ou com oligonucleotídeo 9-3 não

modificado (300 nM, 1000 nM) ou 9-22 (50 nM, 100 nM, 300 nM). As curvas identificadas pelo círculo 62 para os controles mostram extensão em todos os casos, isto é, o pico de fusão do primer a 58 °C desapareceu. A FIG. 6, painel B, mostra um efeito dose-dependente da inclusão de reagente 9-22 DD na mistura de reação: curva 63, 50 nM; curva 64, 100 nM; curva 65, 300 nM. Quanto maior o pico a 58 °C, maior o efeito de prevenção de extensão através de polimerização sob as condições isotérmicas de teste. A FIG. 6, painel C mostra um efeito dose-dependente de inclusão de reagente 9-3 DD na mistura de reação: curva 66, 300 nM; curva 67, 1000 nM. Novamente, quanto maior o pico a 58 °C, maior o efeito de prevenção de extensão através de polimerização sob as condições de teste.

[108] Nós também investigamos o efeito sobre o Fragmento de Stoffel (Lawyer e colaboradores (1993) PCR Methods and Applications 2: 275-287), uma DNA polimerase carecendo de atividade de 5'-3' exonuclease. Nós comparamos vários compostos listados na Tabela 1 com um controle negativo contendo apenas modelo, primer fluorescentemente rotulado, o Fragmento de Stoffel e dNTPs. Nessa série, extensão foi realizada a 40 °C e leituras pelo SYBR Green foram tomadas a cada 20 segundos durante mais de 30 minutos. As curvas foram comparadas a olho nu, que era confiável porque a curva obtida rastreava o controle quase que precisamente ou mesmo a curva obtida diferia acentuadamente do controle. Os compostos foram adicionados em uma concentração de 50 nM, 100 nM e 300 nM. "Hairpins" não modificados 6-22, 9-3, 9-5 e 9-22 não suprimem o alongamento pelo Fragmento de Stoffel em qualquer

concentração. O composto 6-22 DD suprimiu o alongamento em todas as três concentrações, assim como os compostos 9-3DD, 9-5DD e 9-22DD. Os seguintes compostos não suprimem o alongamento em uma concentração de 50 nM ou 100 nM, mas suprimem o alongamento em uma concentração de 300 nM: 9-22-5D, 9-22-3D, 9-5 2'OM⁴, 9-5BHBHQ e 9-32'OM⁴.

Exemplo 7. Efeito sobre a Atividade de Taq Exonuclease na Ausência de Atividade de Polimerase

[109] Nós também descobrimos um ensaio que demonstra a inibição de atividade de 5'-para-3' exonuclease na ausência de síntese de DNA. O ensaio usa, como um substrato específico, uma molécula de DNA fita dupla específica onde uma fita é rotulada com um fluoróforo FAM na extremidade 5' e a outra fita é rotulada na extremidade 3' com um corante silenciador de Dabcila. O fluoróforo está em proximidade íntima com o corante silenciador e a fluorescência não ocorre quando o fluoróforo é estimulado. Desnaturação da fita e anelamento quando de aquecimento e resfriamento causa clivagem da fita FAM-rotulada e liberação de fluoróforo. Nós acreditamos que a ciclização, de algum modo, gera um substrato para a atividade de 5'-para-3' exonuclease da Taq polimerase. A fluorescência aumenta, portanto, proporciona uma medida de atividade de 5'-para-3' exonuclease da Taq polimerase.

[110] A mistura de reação de 25 μ l contém modelo de DNA fita dupla a 300 nM em 1X tampão de PCR, MgCl₂ a 3 mM, 1,25 unidades (U) de Taq polimerase e a presença ou ausência de uma concentração apropriada de composto 9-22 DD. As reações não contêm qualquer dNTP nem qualquer outro alvo de ácido nucléico além do DNA fita dupla. As seqüências das fitas

complementares do modelo de DNA fita dupla são 5' FAM-AGTGTGATGATGGTGAGG -fosfato 3' (SEQ ID NO: 31) e 5' -ACTTTCAACTCTGTCT 3' -Dabcila (SEQ ID NO: 32). As amostras são desnaturadas a 95°C durante 3 minutos e, então, submetidas a ciclos de 95°C durante 10 seg, 67°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg e 45°C durante 20 seg. A fluorescência é adquirida durante cada ciclo a 45 °C.

[111] Leituras de fluorescência de realização do ensaio sobre várias amostras são reportadas na FIG. 7, na qual as leituras são normalizadas para começar na mesma fluorescência de base. A curva 76 é um controle mostrando a fluorescência sem Taq polimerase presente. Taq polimerase foi incluída nas amostras restantes. A curva 71 mostra o aumento de fluorescência resultante quando reagente 9-22 DD não foi adicionado. A fluorescência se elevou uniformemente durante trinta ciclos. As curvas 72-75 mostram o aumento de fluorescência com reagente 9-22 DD incluído em concentrações de 50 nM, 100 nM, 200 nM e 300 nM, respectivamente. A adição de composto 9-22 DD à reação acima reduziu o aumento de fluorescência observado de uma maneira dose-dependente.

Exemplo 8. Amplificação por PCR Simétrica

[112] Nós realizamos amplificação por PCR em tempo real utilizando DNA genômico cisalhado e um par de primers de T_m similar em concentração equimolar. Nós realizamos ensaios repetidos sem e com a adição de reagente 9-3 DD a 400 nM. Os efeitos do reagente foram avaliados em termos de cinética de acúmulo de DNA total via coloração com SYBR Green, bem como uma eletroforese em gel com coloração com brometo de etídio.

[113] A parte destinada à amplificação era um alelo do gene CFTR que ocorre no íntron 19 como uma única transição de base (No. de Acesso ao GenBank AC000061). A mistura de reação de 25 μ l continha um substrato de 120 picogramas (pg) de DNA genômico cisalhado, 1x tampão de PCR, $MgCl_2$ a 5 mM, cada dNTP a 250 μ M, uma diluição a 1:40.000 de SYBR Green, primer dianteiro a 1000 nM: sequência 5' TAATTACAAGAGTCTTCCAT 3' (SEQ ID NO: 33), T_m de 56,6 °C e primer reverso a 1000 nM: sequência 5' CATGAATAGAACATTTTCCTT 3' (SEQ ID NO: 34), T_m de 56,3 °C e 1,25 unidades de Taq polimerase Invitrogen que não é de partida a quente na ausência ou presença de reagente 9-3 DD a 400 nM. As amostras foram amplificadas usando um perfil de ciclicização térmica de 95 °C durante 3 minutos; 60 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 55 °C durante 30 seg e 72 °C durante 30 seg, com a fluorescência de SYBR Green I monitorada a 72 °C e finalmente um gradiente de temperatura de 54 °C para 96 °C em incrementos de 1 °C durante 30 seg. Ao final da reação, várias amostras aleatoriamente selecionadas de cada conjunto de reações foram analisadas através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3,0% em 0,5 X Tris, Ácido Bórico, Solução de EDTA (TBE).

[114] A FIG. 8 apresenta os resultados obtidos. A plotagem de amplificação no painel A da FIG. 8 mostra a fluorescência de SYBR Green I para 60 ciclos com curvas identificadas pelo círculo 81 sendo as amostras repetidas que não contêm o reagente 9-3 DD e curvas identificadas pelo círculo 82 sendo as amostras repetidas com 9-3 DD a 400 nM. A cinética de sinais fluorescentes originários dos dois conjuntos de amostras demonstra que DNA fita dupla

total se acumulou um pouco mais rapidamente na ausência de reagente 9-3 DD do que na presença do reagente, mas a quantidade total de DNA fita dupla acumulada em 60 ciclos é virtualmente idêntica nos dois conjuntos de reações.

[115] O painel B da FIG. 8 mostra os géis eletroforéticos com coloração por brometo de etídio. À esquerda, a fileira a é o marcador de tamanho (diferenças de 50 pares de base) e as fileiras b a i são amostras sem reagente 9-3 DD. À direita, as fileiras j a q são amostras com 9-3 DD a 400 nM e a fileira r é o marcador de tamanho. Os resultados mostram que reações que não contêm o reagente de acordo com a presente invenção geraram o produto correto, bem como muitos produtos não específicos de peso molecular maior, enquanto que as reações que continham reagente 9-3 DD geraram apenas o produto correto. Além disso, reações que continham reagente 9-3 DD geraram cerca de duas vezes mais do produto correto do que as reações que não continham, conforme julgado pelas intensidades relativas da banda de produto correto nos géis.

[116] Em combinação, a análise cinética e a análise eletroforética revelam que reações 81 que geram produtos não específicos produzem sinais fluorescentes mais cedo do que reações 82 que não geram apenas o produto correto. O corante SYBR Green intercala em DNA fita dupla sem relação com a especificidade de sequência. Assim, a cinética sigmoideal das reações 82, quando comparado com a cinética mais retilínea em reações 81, pode ser usada para julgar se uma reação simétrica está ou não acumulando apenas o produto correto.

Exemplo 9. Quantificação de Inibição de Exonuclease

[117] Esse exemplo descreve um ensaio rigoroso para medição do efeito inibitório de um reagente de acordo com a presente invenção sobre a atividade de 5'-3' exonuclease de Taq DNA polimerase. Esse ensaio usa um sistema de primer-modelo similar descrito por M. W. Kaiser, N. Lyamicheva, W. Ma, C. Miller, B. Neri, L. Fors e V. I. Lyamicheva em J. Bio. Chem., 274, páginas 21387-21394 (1999), exceto que o modelo é rotulado com Cy5 na extremidade 5' e o ensaio é realizado na presença de SYBR Green I, um corante de DNA que fluoresce quando ligado ao DNA fita dupla. O modelo para esse ensaio consiste da seqüência de oligonucleotídeo:

5'-Cy5-AAAACGCTGTCTCGCTGAAAGCGAGACAGCGAAAGACGCTCGT-S' (SEQ ID NO: 35) anelada a um primer com a seqüência de nucleotídeo:

5'-ACGAGCGTCTTTC-3' (SEQ ID NO: 36). O oligonucleotídeo mais longo forma uma estrutura de "hairpin" com duas caudas fita simples de diferentes comprimentos. A cauda 5' mais curta do modelo contém o fluoróforo Cy5 e consiste de 4 resíduos de adenosina; a cauda 3' mais longa do modelo serve como o alvo para o oligonucleotídeo de primer, de modo que o primer assenta diretamente na frente da cauda 5' do modelo com um par de base em sobreposição. Adição de SYBR Green I a esse complexo de primer-modalidade resulta em ligação do SYBR Green I às regiões de DNA fita dupla do complexo. Quando de excitação com SYBR Green I com um laser de 480 nm, a energia de fluorescência do corante ligado ao DNA é completamente absorvida pelo Cy5, o que acredita-se que ocorra via transferência de energia de ressonância por fluorescência e não há fluorescência detectável no

comprimento de onda de emissão máxima do SYBR Green (comprimento de onda de emissão máxima: 521 nm). Hidrólise da cauda 5' pela atividade de 5'-3' exonuclease da Taq polimerase resulta em remoção da porção Cy5 do complexo de modelo-primer e restauração da fluorescência detectável do SYBR Green I. A cinética de restauração de fluorescência do SYBR Green I na presença de Taq polimerase proporciona uma medida quantitativa de atividade de 5'-3' exonuclease. Os reagentes de acordo com a presente invenção inibem a atividade de 5'-3' exonuclease da Taq polimerase e diminuem o aumento de fluorescência do SYBR Green I.

[118] O ensaio consistia de 0,5 μ M do modelo acima e 1,5 μ M do primer acima misturados em 1X tampão de PCR, $MgCl_2$ a 3 mM, uma diluição a 1:40000 de um estoque de SYBR Green I comercial (Molecular Probes, Eugene, OR), 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen, Calrsbad, CA) na ausência ou presença de composto 9-22 DD a 50 nM, 100 nM, 300 nM ou 1000 nM em um volume de 25 microlitros (μ l). Não houve adição de dNTPs na mistura de reação porque o ensaio não conta com atividade de DNA polimerase. A mistura de reação menos o modelo e primer foi ajustada a 25 °C para promover a interação entre o composto 9-22 DD e a Taq DNA polimerase. A amostra foi, então, colocada sobre gelo, suplementada com modelo e primers e mantida sobre gelo até o início de reação. Controles negativos careciam de Taq DNA polimerase. A reação foi iniciada através da incubação da amostra a 25 °C em um ABI Prism Sequence Detector 7700 durante 60 minutos com coleta de fluorescência no canal de SYBR Green I a cada 30 segundos. A média de três experimentos diferentes foi calculada para cada controle e

para cada concentração de reagente 9-22 DD.

[119] A FIG. 9 apresenta os resultados do ensaio. Fluorescência detectável de SYBR Green I proporciona uma medida da extensão de atividade de 5'-3' exonuclease. O controle "Sem Taq" não mostra sinal de fluorescência de SYBR consistente com absorção completa de fluorescência de SYBR Green I por Cy5 e ausência completa de atividade de 5'-3' exonuclease (linha 96). A adição de Taq polimerase restaura a fluorescência de SYBR Green I e proporciona uma linha de base para os níveis máximos de atividade de 5'-3' exonuclease sob as condições do ensaio (linha 91). A adição de composto 9-22 DD à mistura de reação diminui a restauração de fluorescência de SYBR Green I de uma maneira dosagem-dependente em virtude do efeito inibitório do 9-22 DD sobre a atividade de 5'-3' exonuclease de Taq polimerase (linha 92, 50 nM: linha 93, 100 nM; linha 94, 300 nM; linha 95, 1000 nM). A Tabela III abaixo quantifica a inibição percentual de atividade de 5'-3' exonuclease por várias concentrações do composto 9-22 DD baseado nos níveis relativos de fluorescência de SYBR Green I obtidos após incubação de 60 minutos a 25 °C.

TABELA III

Reação	Fluorescência	Inibição % de 5'-3' exonuclease
No 9-22DD	1378 unidades	0,0
9-22DD a 50 nM	1315 unidades	4,6
9-22DD a 100 nM	1155 unidades	16,2
9-22DD a 300 nM	989 unidades	28,2
9-22DD a 1000 nM	624 unidades	54,7
No. Taq:	0 unidades	Sem atividade de 5'-3' exonuclease

Exemplo 10: Prevenção da Formação de Primer-Dímero e

Oligomerização na Presença e Ausência de DNA Alvo

[120] Uma série de reações de amplificação por LATE-PCR foram ajustadas na presença ou ausência de 100 genomas de DNA placentário humano (Sigma, St Louis, MO) em um volume de 25 μ l. Nesse experimento, reações de amplificação por LATE-PCR consistiam de 1X tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), $MgCl_2$ a 3 mM, dNTP a 0,25 mM, Primer em Excesso a 1000 nM, Primer Limitado a 50 nM, fita de sonda FAM-rotulada a 0,25 μ M, fita complementar reversa Dabcila-rotulada a 0,3 μ M, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). A sequência dos primers e sondas eram como segue:

Primer em Excesso: 5' GTTTCTTTGCTGCCGTGTTTC 3' (SEQ ID NO: 37)

Primer Limitado: 5' CCCCAGAGACCCCAGTTGCTAACCAGAC 3' (SEQ ID NO: 38)

Fita de sonda FAM-rotulada: 5' [TET] AGACAGAGTTGAAAGTCAGG [Phos] 3' (SEQ ID NO: 39)

Fita complementar reversa Dabcila-rotulada: 5' ACTTTCAACTCTGTCT [Dabcila] 3' (SEQ ID NO: 40)

[121] Esses primers e sondas amplificam e detectam um amplicons de 488 pares de base (bp) que abrange os éxons 5 e 6 do gene de p53 humano. Amplificação foi realizada em um ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA) com um perfil térmico que consistia de 1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos; 25 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 64 °C durante 30 seg, 75 °C durante 30 seg; e 35 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 64 °C durante 30 seg, 75 °C durante 30 seg, 45 °C durante 20 seg e com detecção de fluorescência no canal TET durante a etapa a 45 °C.

[122] Os produtos da amplificação resultantes foram analisados através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3% em 0,5X tampão TBE durante 2 horas e corados com brometo de etídio. Os resultados são mostrados na FIG. 10. As amostras nas fileiras 3, 5, 7, 9, 11 tinham sido preparadas sem DNA genômico. As amostras nas fileiras 2, 4, 6, 8, 10 tinham sido preparadas com DNA genômico. A fileira 1 continha marcadores de tamanho eletroforéticos em uma ladder de 100 pares de base. Reagente 9-22 DD foi adicionado às reações iniciais como segue: fileiras 2 e 3, 0 nM; fileiras 4 e 5, 50 nM; fileiras 6 e 7, 100 nM; fileiras 8 e 9, 200 nM; fileiras 10 e 11, 300 nM.

[123] Adjacente ao lado direito do gel, nós marcamos o tamanho do produto correto e também tamanhos que nós inferimos como sendo primer-dímeros e oligômeros de primer. Os resultados apresentados na FIG. 10 demonstram que, em reações iniciadas com DNA genômico, aumento da concentração de reagente 9-22 DD atua de uma maneira dosagem-dependente para impedir manifestação de produtos não específicos, incluindo primer-dímeros e oligômeros de primer e, desse modo, aumenta a especificidade e rendimento dos produtos corretos. Concentrações crescentes de 9-22 DD também impedem a manifestação de primer-dímeros e oligômeros de primers em reações que não contêm DNA genômico.

Exemplo 11. Prevenção da Formação de Primer-Dímero em uma Reação Duplex

[124] Uma série de reações de amplificação por LATE-PCR foi ajustada na presença ou ausência de 100 genomas de DNA placentário humano (Sigma, St Louis, MO) em um volume final de 25 μ l. Nesse experimento, reações de amplificação por

LATE-PCR consistiam de 1X tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), $MgCl_2$ a 3 mM, dNTP a 0,20 mM. Taq polimerase foi usada a 1,25 unidades em cada amostra. Uma primeira sequência alvo de amplificação (Produto 1) era uma parte do éxon 11 do Gene da Fibrose Cística e foi amplificado com um Primer Limitado: 5' GACGTTTACAGCGAATGCTTGCTAGACCAAT 3' (SEQ ID NO: 41) a 100 nM e um Primer em Excesso: 5' TCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAAT 3' (SEQ ID NO: 42) a 2.000 nM. Uma segunda sequência alvo de amplificação (Produto 2) era uma parte do éxon 10 do Gene da Fibrose Cística e foi amplificado com um Primer Limitado: 5' CAGTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACCAT 3' (SEQ ID NO: 43) a 50 nM e um Primer em Excesso: 5' GCTTTGATGACGCTTCTGTATCTA 3' (SEQ ID NO: 44) a 1000 nM.

[125] Amplificação foi realizada em um ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA) durante 2 min a 95 °C, seguido por 25 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 56 °C durante 15 seg, 70 °C durante 20 seg, seguido por 50 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 56 °C durante 15 seg, 70 °C durante 20 seg e 45 °C durante 30 seg, com aquisição de fluorescência.

[126] Os produtos da amplificação resultante foram analisados através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3% em 0,5X tampão TBE durante 2 horas e corado com brometo de etídio. Os resultados são mostrados na FIG. 11. Reações analisadas nas fileiras 1-6 utilizaram uma Taq polimerase que não era de partida a quente, enquanto que as reações analisadas nas fileiras 7-12 utilizaram uma Taq polimerase mais um anticorpo de partida a quente. Reagente 9-22 DD foi adicionado para analisar as reações nas

fileiras 4-6 e 10-12 a 100 nM.

[127] Adjacente ao lado direito do gel, nós adicionamos nossa interpretação das identidades dos produtos da amplificação, incluindo amplicons fita simples (ssDNA) e amplicons fita dupla (dsDNA) do Produto 1 e Produto 2, bem como produtos mais curtos que nós inferimos com sendo primer-dímeros. Outros produtos não específicos são marcados com um asterisco. Amplificações com polimerase que não é de partida a quente e sem reagente de acordo com a presente invenção, fileiras 1-3, produziram primers-dímeros e outros produtos não específicos. Amplificações com polimerase de partida a quente e sem reagente de acordo com a presente invenção, fileiras 7-9, estavam sobre o todo um pouco mais limpas, mas ainda mostravam uma manifestação de iniciação errônea. Adição de reagente de acordo com a presente invenção às amplificações de partida a quente, fileiras 10-12, produziu apenas os produtos pretendidos. A adição de reagente de acordo com a presente invenção às amplificações que não são de partida a quente, fileiras 4-6, eliminou primer-dímeros e, em duas das três repetições (fileira 4 e fileira 6), todos os outros produtos não específicos também, com apenas uma repetição (fileira 5) manifestando um produto não específico. Os resultados apresentados na FIG. 11 demonstram que uma baixa concentração (100 nM) de reagente 9-22 DD era suficiente para impedir a formação de primer-dímeros quando Taq polimerase que não é de partida a quente ou Taq polimerase que não é de partida era usada e ainda que uma baixa concentração de reagente 9-22 DD era aproximadamente suficiente para impedir todas as manifestações de iniciação

errônea, mesmo quando usado com Taq polimerase que não é de partida a quente em amplificações de dois alvos com dois pares de primer.

Exemplo 12. Otimização da Cinética de uma PCR em Tempo Real Duplex e PCR em Tempo Real Impedindo a Formação de Primer-Dímero

[128] Nós projetamos um ensaio de LATE-PCR em tempo real duplex para amplificação simultânea de seqüências dentro de éxons dos genes Oct4 e Xist de murino (Número de Acesso ao GenBank NM_013633 e L04961, respectivamente). Cada reação foi operada em um volume final de 50 μ l e continha os seguintes reagentes: 1X tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) compreendido de Tris-HCl a 20 mM, pH de 8,4 e KCl a 50 mM, MgCl₂ a 3 mM, cada dNTP a 0,4 mM, Primer Limitado Oct4 a 50 nM tendo a seqüência 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (SEQ ID NO: 45), Primer em Excesso Oct4 a 2 μ M tendo a seqüência 5' CAACTTGGGGGACTAGGC 3' (SEQ ID NO: 46), Primer Limitado Xist a 100 nM tendo a seqüência 5' GGTCGTACAGGAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (SEQ ID NO: 47), Primer em Excesso Xist a 2 μ M tendo a seqüência 5' TGAAAGAAACCACTAGAGGGCA 3' (SEQ ID NO: 48), sinalizador molecular Oct4 de baixa T_m a 1 μ M tendo a seqüência 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcila 3' (SEQ ID NO: 49) e 2 unidades de Taq DNA polimerase Platinum em complexo com anticorpo (Invitrogen, Carlsbad, CA). Composto 9-3 DD ou composto 9-3bDD também foi incluído na mistura de PCR, nas concentrações especificadas abaixo. Um sinalizador molecular para a detecção de amplicons Xist não foi adicionado nesse exemplo. Cada ensaio também continha os reagentes necessários para lise de célula e transcrição

reversa, de acordo com o protocolo PurAmp (veja Hartshorn e colaboradores (2005) BMC Biotechnol 5: 2) em um volume de 2,5 μ l. Nessa LATE-PCR duplex, as concentrações finais de tais reagentes eram as seguintes: Tris acetato a 2,5 mM, pH de 8,4, acetato de potássio a 3,75 mM e acetato de magnésio a 0,4 mM (Tampão de Síntese de cDNA diluído, ThermoScript™ RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA), cada dNTP a 50 μ M, isotiocianato de guanidina a 0,13 mM, β -mercapto-etanol a 6,7 μ M, citrato de sódio a 0,7 μ M, pH de 7,0, 0,7 x 10⁻⁴% (vol/vol) de sulfóxido de dimetila e 0,2 x 10⁻⁴% de sarcosila.

[129] DNA genômico de camundongo (Sigma, St Louis, MO) também foi adicionado a cada ensaio e fornecido aos modelos para amplificação por PCR. O número de genomas adicionado a cada tubo foi calculado baseado em um tamanho de genoma de 6 pg (veja Vendrely e Vendrely (1949) Experientia 5: 327-329).

[130] Amplificação foi realizada em um ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA) com um perfil de ciclo térmico compreendido por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutes; 15 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 63 °C durante 20 seg e 72 °C durante 30 seg; e 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg, 55 °C durante 25 seg, 72 °C durante 35 seg, and 45 °C durante 30 seg, com aquisição de fluorescência a 45 °C no canal TET.

[131] Ao final da amplificação por PCR, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3% em 0,5X tampão TBE durante 2 horas e corados com brometo de etídio. Os produtos fita dupla e fita simples, de tamanhos esperados, eram visíveis para os

dois genes co-amplificados, indicando LATE-PCR duplex eficaz.

[132] A FIG. 12 ilustra o efeito de variação da composição da haste do reagente 9-3 DD sobre a cinética da LATE-PCR duplex descrita acima, contendo dois conjuntos de primers para a amplificação de duas seqüências não-homólogas dentro dos genes *Oct4* e *Xist*. A figura mostra os sinais de fluorescência gerados pelo acúmulo de amplicons *Oct4* através de hibridização com o sinalizador molecular TET-*Oct4*. Os resultados demonstram que os valores de C_T são muito similares na presença de 9-3DD a 300 nM (linhas com triângulos) ou na mesma concentração de sua forma não modificada 9-3bDD (linhas cheias sem triângulos) em cada concentração de genoma analisada (10 genomas, círculo 122; 100 genomas, círculos 123; 1000 genomas, círculo 124). A cinética dos sinais fluorescentes em tempo real é, na verdade, afetada pela composição da haste do reagente. O composto 9-3bDD tem uma maior T_m de haste comparado com o 9-3DD, assim, nós acreditamos, impedindo otimamente a formação de primer-dímero o que, por sua vez, resulta em sinais muito lineares e paralelos em todas as concentrações de genoma testadas. Na presença de composto 9-3DD menos estrigente, na verdade, alguns dos sinais fluorescentes têm um declínio gradual, mas outros começam a se nivelar precocemente na reação, indicando formação aleatória de primer-dímeros. Sinais gerados em diferentes concentrações de modelo com composto 9-3DD são menos paralelos do que aqueles obtidos na presença de composto 9-3bDD (com a haste modificado). Amplificação linear que gera sinais perfeitamente paralelos (tendo um declínio constante) é

idealmente desejável e particularmente relevante para tipos de análise de ponto de término (*end-point*).

[133] Análise de gel de agarose das amostras contendo 9-3DD revelou bandas, particularmente visíveis em maiores números de modelo, que podem ser primer-dímeros e bandas muito pequenas em menores números de modelo são consistentes com primers. Tais bandas não aparecem quando de análise das amostras contendo 9-3bDD.

[134] A FIG. 13 ilustra o efeito de variação da concentração de reagente 9-3bDD na LATE-PCR duplex descrita nesse exemplo e também usada para a FIG. 12. Nesse caso, diminuição da concentração de reagente 9-3bDD de 300 nM (linhas cheias sem triângulos) para 200 nM (linhas com triângulos) novamente afeta o declínio de amplificação linear em virtude da formação de primer-dímero, conforme confirmado através de análise de gel de agarose. Como um resultado, algumas das amostras contendo baixos números iniciais de modelo (10 genomas, círculo 132) têm uma fluorescência no último ciclo ("*end-point*"/ponto de término) maior do que amostras contendo números iniciais de modelo maiores (100 genomas, círculo 133 e 1000 genomas, círculo 134).

[135] O efeito sobre a concentração dos reagentes descritos no presente pedido de patente sobre a eficácia de PCR também foi testado em uma LATE-PCR amplificando um modelo com um par de primers. O modelo amplificado era a mesma sequência *Oct4* de murino usada na duplex descrita para a FIG. 12 e FIG. 13 e as seqüências de primer e sinalizador molecular também eram as mesmas conforme naquela reação.

[136] Cada reação foi realizada em um volume final de 100 μ l e continha os seguintes reagentes: 1X tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) compreendido de Tris-HCl a 20 mM, pH de 8,4, e KCl a 50 mM, $MgCl_2$ a 3 mM, cada dNTP a 0,25 mM, Primer Limitado Oct4 a 50 nM, Primer em Excesso Oct4 a 2 μ M, sinalizador moléculas TET-Oct4 de baixa T_m a 1 μ M e 2 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® em complexo com anticorpo (Invitrogen, Carlsbad, CA). Composto 9-3 DD também foi incluído na mistura de PCR, em concentrações de 150 ou 300 ou 450 nM. Conforme no caso da duplex antes mencionada (veja FIG. 12 e FIG. 13), cada ensaio também continha os reagentes necessários para lise de célula e transcrição reversa de acordo com o protocolo PurAmp, em um volume de 10,5 μ l. Nessa LATE-PCR, as concentrações finais de tais reagentes eram como segue: Tris acetato a 5 mM, pH de 8,4, acetato de potássio a 7,5 mM e acetato de magnésio a 0,8 mM (Tampão de Síntese de cDNA diluído), 1 ng/ μ l de Random Hexamers e cada dNTP a 100 μ M (todos componentes de um ThermoScript™ RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA), isotiocianato de guanidina a 0,4 mM, β -mercapto-etanol a 20 μ M, citrato de sódio a 2 μ M, pH de 7,0, $2 \times 10^{-4}\%$ (vol/vol) de sulfóxido de dimetila e $0,5 \times 10^{-4}\%$ de sarcosila.

[137] DNA genômico de camundongo também foi adicionado a cada ensaio e proporcionou os modelos para amplificação por PCR, conforme especificado para a LATE-PCR duplex descrita nesse exemplo. Amplificação foi novamente realizada em um ABI Prism 7700 Sequence Detector com o mesmo perfil térmico detalhado para a reação duplex. Ao final da PCR, os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel em um gel de agarose a 3% em

0,5X tampão TBE durante 2 horas e corados com brometo de etídio. Os produtos fita dupla e fita simples eram visíveis sobre o gel e tinham os tamanhos esperados, indicando amplificação eficaz por LATE-PCR.

[138] Os efeitos de aumento das concentrações de composto 9-3 DD sobre a eficácia de amplificação do modelo *Oct4* também foram testados. Os valores de C_T foram obtidos a partir de ensaios de PCR em tempo real contendo 5 genomas (média de duas réplicas para cada concentração de 9-3DD testada), 20 genomas (média de duas réplicas para cada concentração de 9-3DD testada), 100 genomas e 1000 genomas realizados com cada uma das concentrações de 9-3DD testadas: 150 nM, 300 nM, 450 nM. A regressão linear para cada série de pontos de C_T em cada concentração é mostrada na FIG. 14, onde triângulos são a concentração de 450 nM, quadrados abertos são 300 nM e quadrados cheios são 150 nM. É imediatamente evidente a partir dessa plotagem que 9-3DD a 450 nM retarda grandemente o aparecimento dos sinais fluorescentes acima do limiar, também alterando a dose-dependência da amplificação por PCR (veja os pontos a 10 cópias de gene e 40 cópias de gene, distante da linha de regressão). Os valores de C_T obtidos usando 9-3DD a 150 nM ou 300 nM, por outro lado, são muito similares e demonstram uma relação linear entre o número de cópias e o sinal fluorescente que aparece primeiro.

[139] Análise dos padrões em tempo real da fluorescência, contudo, realça a diferença entre as duas condições (concentrações), conforme ilustrado na FIG. 15. O declínio das curvas geradas por 100 genomas, círculo 151 ou 1000 genomas, círculo 152, é mais gradual quando de uso de

9-3DD a 300 nM (linhas cheias sem triângulos) do que quando de uso de 9-3DD a 150 nM (linhas com triângulos), sugerindo que as condições mais estridentes, 300 nM, eliminam primer-dímeros, assim, aumentando a eficácia de amplificação.

Exemplo 13. Uso de Múltiplos Reagentes de Acordo com a Presente Invenção

[140] Misturas de reação de LATE-PCR foram preparadas para amplificar cinco seqüências alvo diferentes de material de iniciação de DNA genômico humano individualmente e amplificar todos os cinco juntos em uma reação multiplex. Cada seqüência alvo requeria seu próprio par de primers limitado e em excesso. As seqüências alvo eram (1) um alelo de globina de 191 pares de base, (2) um alelo G269 de Tay Sachs de 312 pares de base, (3) um alelo 1278 e 1421 de Tay Sachs de 452 pares de base, (4) um segmento de 549 pares de base de região 1 hipervariável Mitochondrial e (5) um segmento de 611 pares de base compreendendo os éxons 7 e 8 do gene p53. As misturas de reação de 25 μ l continham 1X tampão de PCR (Invitrogen), dNTPs a 0,4 mM, Mg^{++} a 3 mM, 0,24 x SYBR Green e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os primers foram adicionados em uma concentração de 50 nM para Primer Limitado e 1000 nM para Primer em Excesso. Todos os cinco pares de primer foram adicionados às reações multiplex. Ciclização térmica foi quarenta e cinco ciclos de 95 °C durante 10 seg, 64 °C durante 20 seg e 72 °C durante 1 min.

[141] As misturas de reação com pares de primers individuais e alvos individuais e as misturas de reação com todos os cinco pares de primer e todos os cinco alvos foram

amplificadas na presença de uma combinação de composto 9-22DD a 25 nM e composto 12-3DD a 100 nM. A mistura de reação pentaplex foi amplificada também sem a adição de qualquer reagente de acordo com a presente invenção. Os produtos da reação foram examinados através de eletroforese em gel. Resultados da eletroforese em gel das várias amplificações são mostrados na FIG. 16, a qual inclui marcadores de tamanho (diferenças de 100 pares de base) na fileira r. As fileiras centrais g-k são os produtos de amplificações individuais das seqüências alvo (1) - (5), respectivamente. As fileiras l-q são os produtos de seis amplificações pentaplex repetidas que incluíam a mistura de composto 9-22DD e 12-3DD. As fileiras a-f são os produtos de seis amplificações pentaplex que não incluíam reagente de acordo com a presente invenção. A FIG. 16 mostra que a mistura de compostos intensificou a amplificação (mais amplicons desejados e mais limpos) quando comparado com a reação multiplex sem adição de qualquer composto, demonstrando que misturas de reagentes podem ser usadas em kits, amplificações e ensaios da presente invenção.

Exemplo 14. Testagem dos Modos de Ação

[142] Nós projetamos um teste para investigar quantitativamente a redução de iniciação errônea (aperfeiçoamento da especificidade) e efeitos de inibição de polimerase dos reagentes de acordo com a presente invenção, a qual nós acreditamos que distingue o Primeiro Modo do Terceiro Modo de ação. O teste é um ensaio de amplificação por PCR essencialmente similar ao ensaio descrito no Exemplo 1, com as seguintes exceções: a mistura de reação de amplificação contém metade (1000 genomas) do

DNA genômico cisalhado e a porção final da ciclização térmica é reduzida de 70 ciclos para 40 ciclos. As amplificações foram realizadas com a adição de quantidades variadas de reagente de acordo com a presente invenção, tipicamente 25 nM, 50 nM, 100 nM, 300 nM, 1500 nM e 3000 nM. O teste inclui duas análises: primeiro, para especificidade, uma curva de fusão do produto amplificado; e, segundo, para inibição, uma curva de fluorescência em tempo real do produto fita dupla que está sendo sintetizado.

[143] As FIGS. 17-18 apresentam partes dos resultados analíticos para dois reagentes de acordo com a presente invenção, composto 12-3DD e composto 12-C3DD, respectivamente. Em cada figura, a Coluna I apresenta as curvas de fusão para várias concentrações selecionadas de reagente, conforme indicado. Em cada figura, a Coluna II apresenta as curvas de fluorescência em tempo real para as mesmas concentrações, conforme indicado. Fazendo referência à FIG. 17, Coluna I, as curvas de fusão mostram que o composto 12-3DD obteve alta especificidade (evitando iniciação errônea) em concentrações de 100 nM e acima (a menor concentração, 100 nM, sendo ligeiramente maior do que aquela encontrada para a reação descrita no Exemplo 1). Fazendo referência à FIG. 17, Coluna II, as curvas de fluorescência em tempo real mostram que a inibição de polimerase aumentou progressivamente à medida que a concentração de composto 12-3DD foi aumentada para acima de 100 nM, até que a reação foi essencialmente interrompida em concentrações acima de 1000 nM. A inibição é refletida na menor quantidade de produto(s) fita dupla total gerado(s)

(incluindo o produto específico desejado e produtos não específicos de iniciação errônea) indicado pelo nível de fluorescência em um platô e pelo retardo no valor de G1 (19,6 para 100 nM, 21,1 para 300 nM e não existente, isto é, pelo menos 40 para 1500 nM e 3000 nM). Fazendo referência à FIG. 18, Coluna I, as curvas de fusão mostram que composto 12-3DD obteve alta especificidade em concentrações de 300 nM e acima (a menor concentração, 300 nM, sendo a mesma conforme aquela encontrada para a reação descrita no Exemplo 1). Fazendo referência à FIG. 18, Coluna II, as curvas de fluorescência em tempo real mostram que a inibição de polimerase aumentou progressivamente à medida que a concentração de composto 12-C3DD era aumentada para acima de 300 nM (valores de CT eram de 18,8 para 100 nM, 18,8 para 300 nM, 21,1 para 1500 nM e 24,5 para 3000 nM), mas essa reação não foi interrompida mesmo em uma concentração de 3000 nM.

[144] Comparando a FIG. 17 e FIG. 18, pode ser observado que o desempenho global do composto 12-C3DD é menos dependente da concentração do que o desempenho global do composto 12-3DD. Assim, para essa reação de amplificação em particular, o retardo de CT e diminuição de fluorescência de platô resultantes à medida que a concentração de composto 12-C3DD vai de 300 nM para 1500 nM são aproximadamente os mesmos que resultam à medida que a concentração de composto 12-3DD vai de 100 nM para 300 nM.

[145] Uma série de modalidades da invenção foi descrita. Todavia, será compreendido que várias modificações podem ser feitas sem se desviar do espírito e escopo da invenção. Conseqüentemente, outras modalidades

estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Reagente que não contribui com fluorescência de base, mas que é capaz de prevenir pelo menos uma manifestação de iniciação errônea em uma amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) para produzir pelo menos um produto de DNA amplificado quando adicionado em uma concentração de não mais do que 650 nM a uma mistura de amplificação por PCR que inclui 1,25 unidades de uma DNA polimerase termoestável por 25 μ l de mistura de reação, **caracterizado** pelo fato do referido reagente compreender uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO: 1 a 12 e pelo fato do referido reagente ser um oligonucleotídeo não-extensível que tem uma extremidade 3' e uma estrutura em haste-alça que não é uma sonda de hibridização para o referido pelo menos um produto de DNA amplificado, que tem uma alça que compreende de 1 a 22 nucleotídeos ou um ligante químico eletricamente neutro, que tem uma haste compreendendo uma região de dupla fita que é maior do que seis nucleotídeos em comprimento e um término longe da alça compreendendo um nucleotídeo 3' e um nucleotídeo 5', a referida haste tendo uma temperatura de fusão calculada da haste (T_m) abaixo de 94 °C, em que:

(a) a extremidade 3' é não extensível pela referida DNA polimerase; e

(b) o referido término da haste é estabilizado por meios não fluorescentes selecionados a partir do grupo consistindo em porções de dissipador de fluoróforo não fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos 3' e 5' do referido término da haste e 2'-O-metil ribonucleotídeos que se ligam mais fortemente do que um

híbrido de DNA-DNA natural na extremidade da haste.

2. Reagente, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da alça ser um oligonucleotídeo compreendendo pelo menos três nucleotídeos.

3. Reagente, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da alça ser uma ponte de metileno de 3-6 átomos de carbono.

4. Reagente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato da haste compreender uma região de dupla fita de 9-12 pares de base.

5. Reagente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato da temperatura de fusão calculada da haste estar na faixa de 72-85°C.

6. Reagente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato da temperatura de fusão calculada da haste estar na faixa de 50-71°C.

7. Kit de reagentes para realização de uma amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) **caracterizado** pelo fato de compreender uma DNA polimerase termoestável, pelo menos um par de primers de PCR, dNTP's e pelo menos um reagente como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda reagentes para isolamento de ácido nucleico.

9. Conjunto de oligonucleotídeos para realização de uma amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) **caracterizado** pelo fato de compreender pelo menos um par de

primers de PCR e pelo menos um reagente como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

10. Conjunto, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de incluir ainda pelo menos uma sonda fluorescentemente rotulada que se hibridiza ao produto amplificado definido pelo referido pelo menos um par de primers de PCR.

11. Conjunto, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de pelo menos um par de primer incluir um primer limitado e um primer em excesso em uma proporção apropriada para realização de uma amplificação por PCR linear-após-o-exponencial (LATE-PCR).

12. Conjunto, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato do referido produto amplificado ser fita simples.

a a b b c c d d e e f f g g h h i i

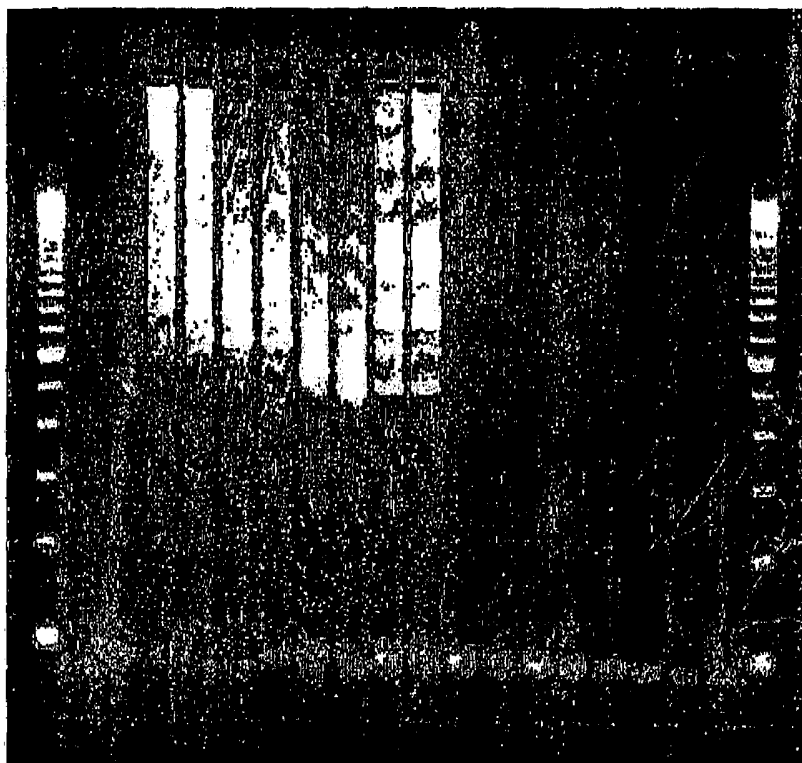


FIG. 1

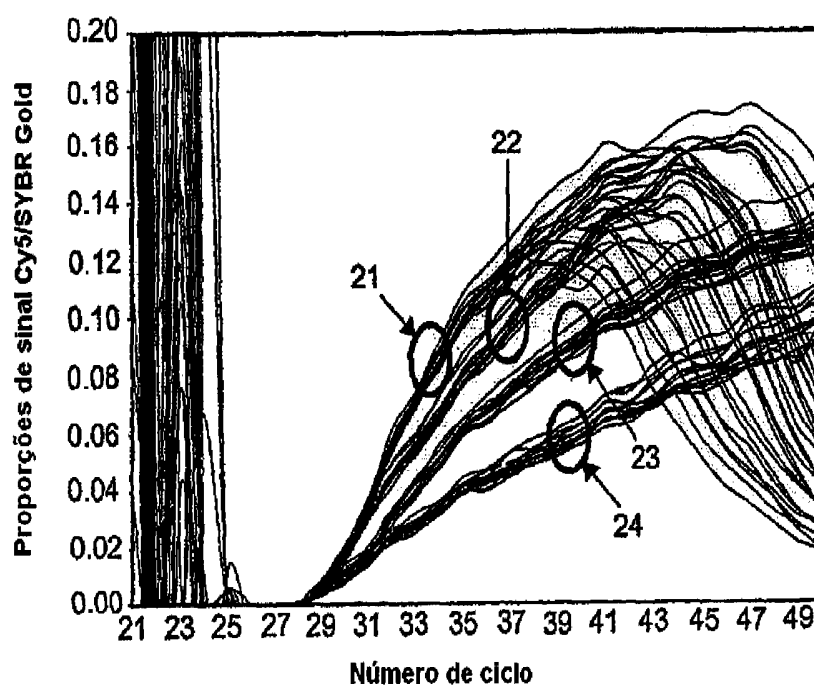


FIG. 2

190 200 210 220 230 240 250 260 270 280
ATTGGGAAGGTGTTGAGAGGCGACCGTGGAGTTACCCGACCATCACCAGACTGTTGCTTGTTTTCCCTCAGGTACCCCTGAGCAGAGGC



FIG. 3

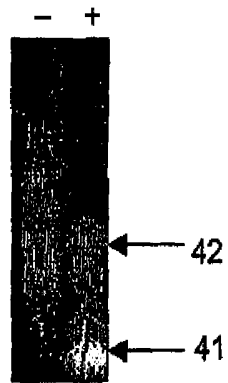


FIG. 4A

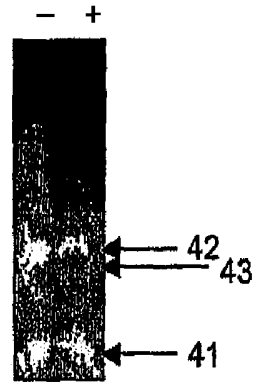


FIG. 4B

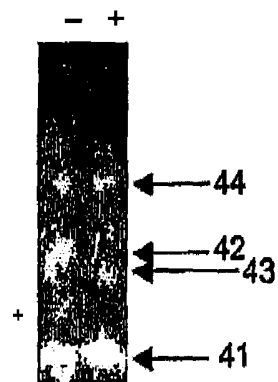


FIG. 4C

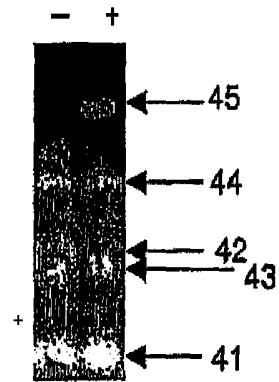


FIG. 4D

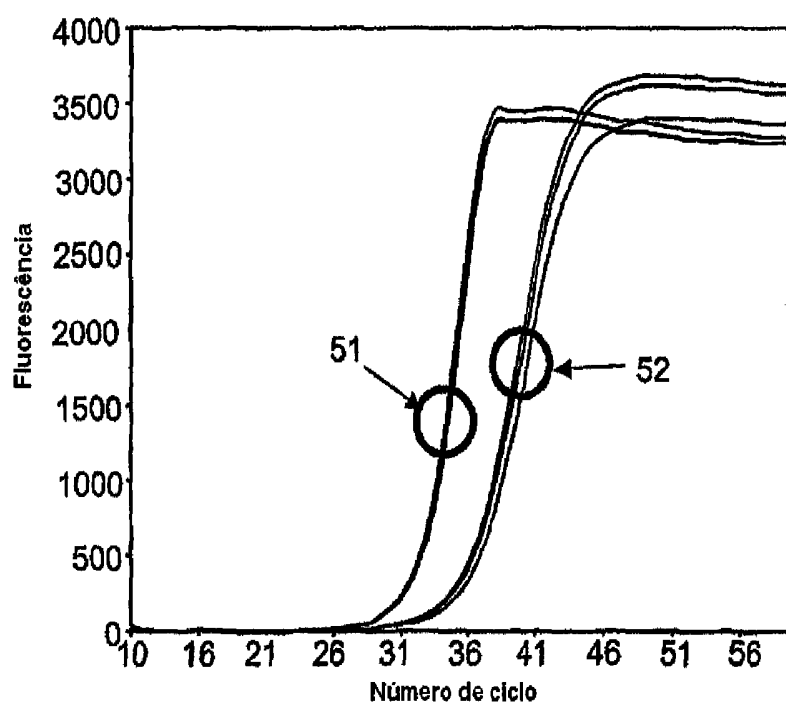


FIG. 5A

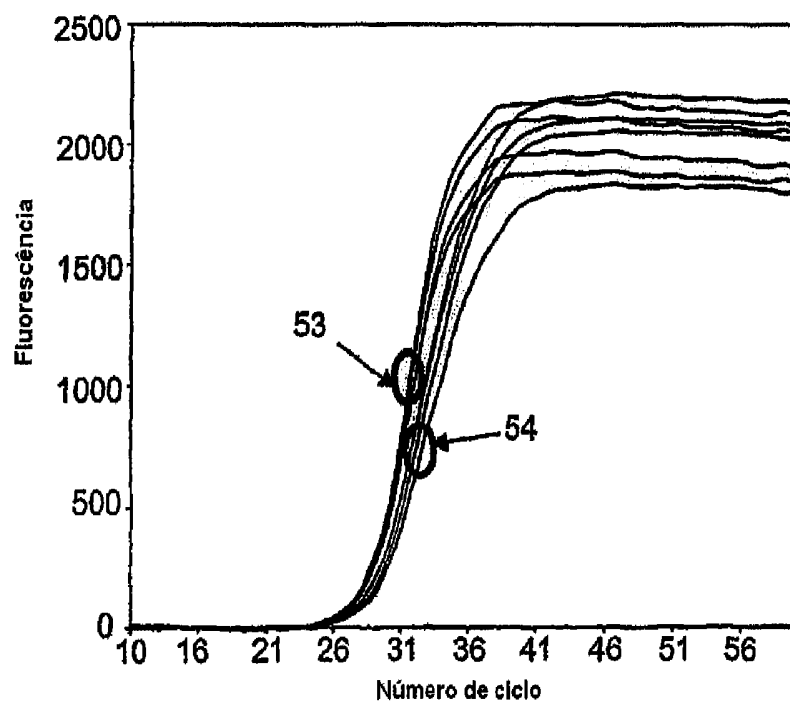


FIG. 5B

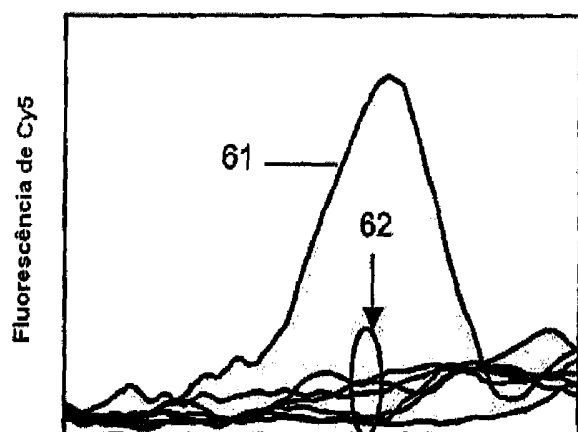


FIG. 6A

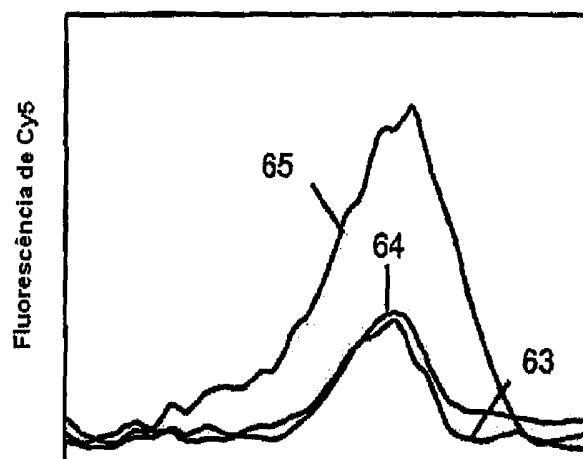


FIG. 6B

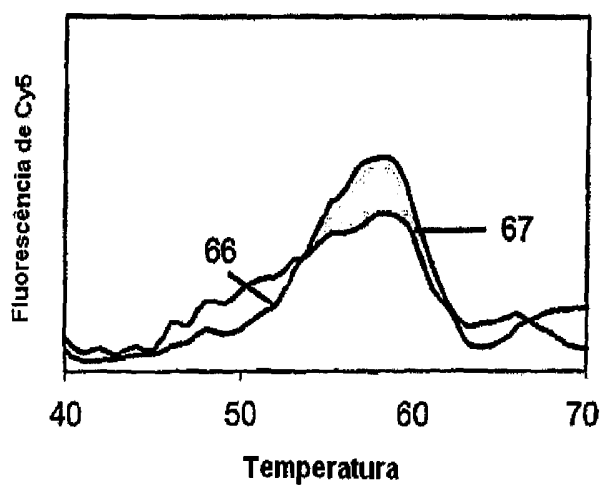


FIG. 6C

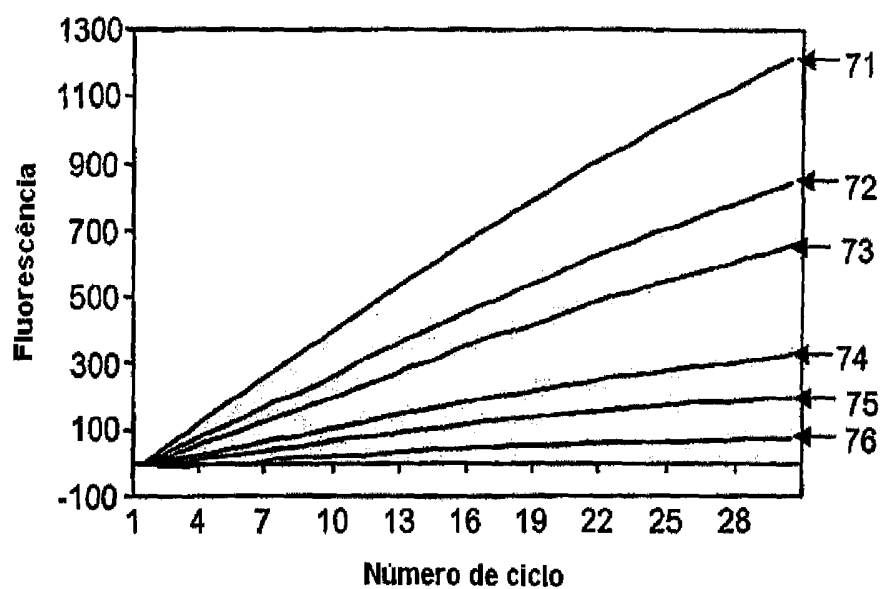


FIG. 7

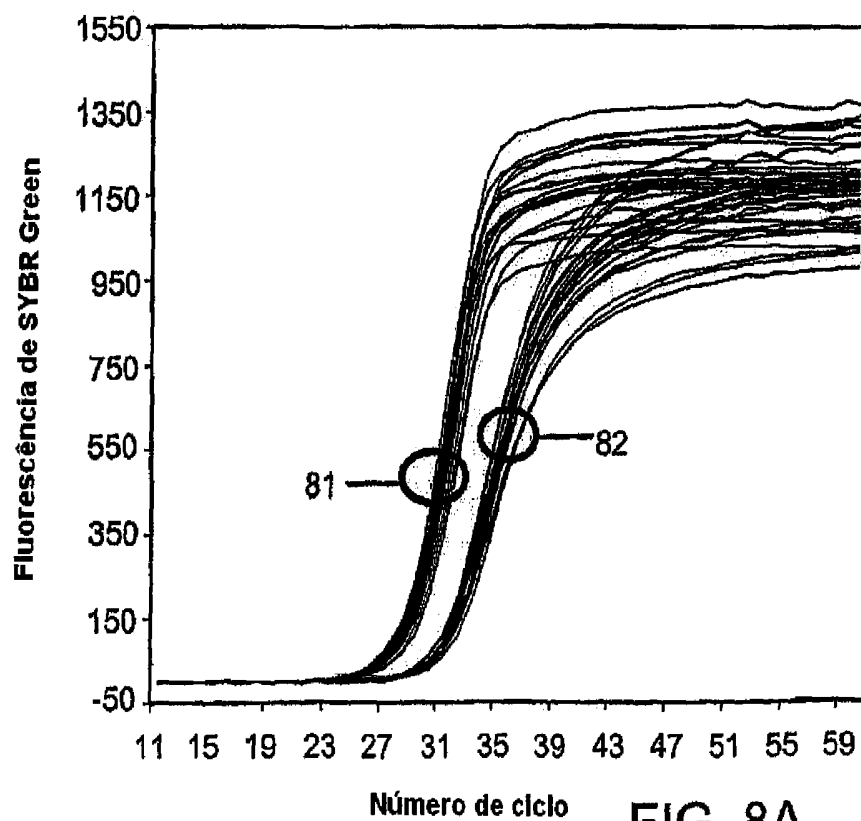


FIG. 8A

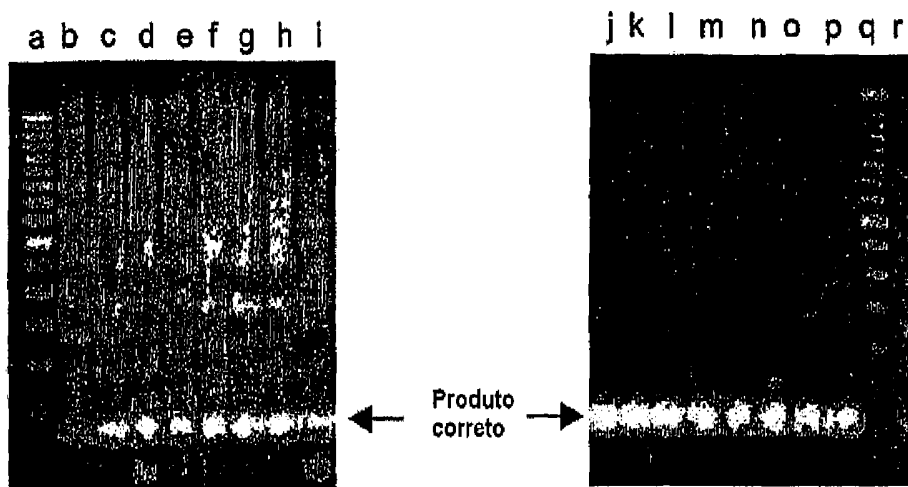


FIG. 8B

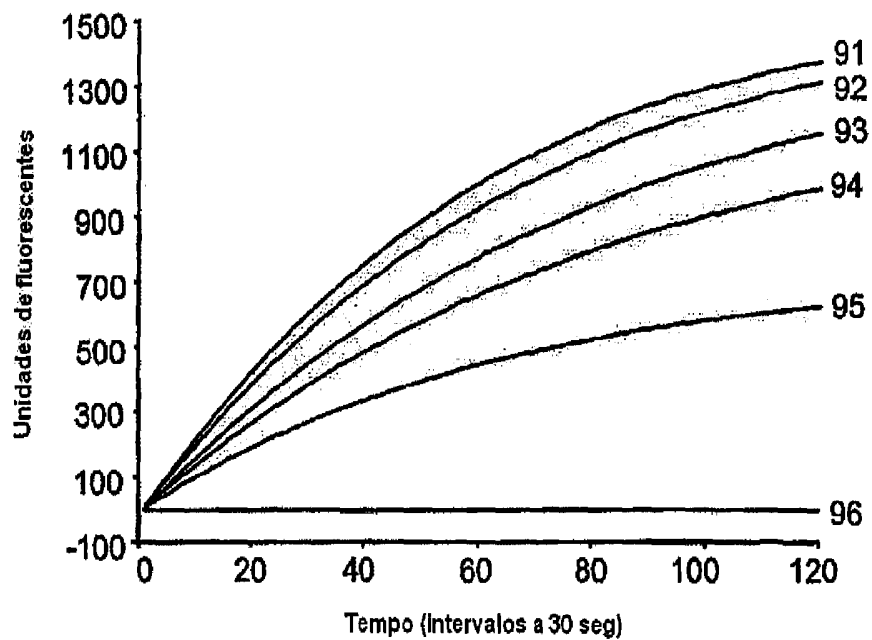


FIG. 9

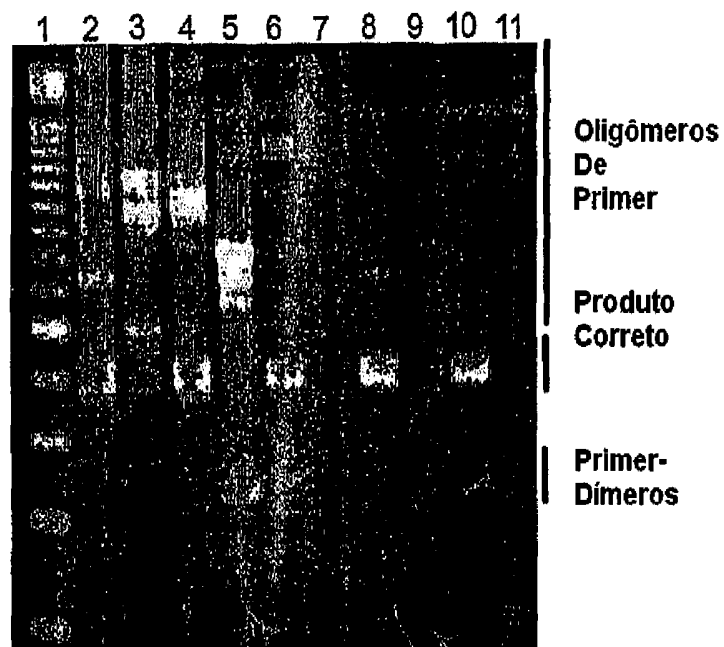


FIG. 10

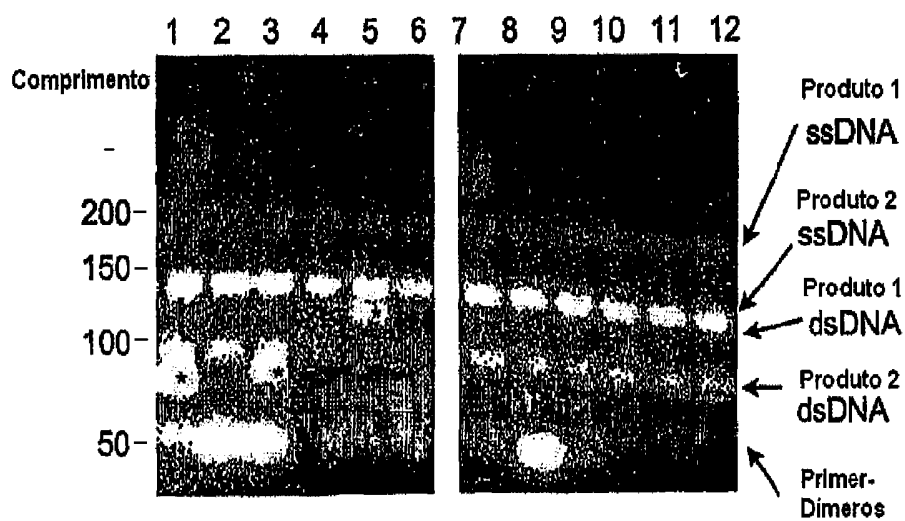


FIG. 11

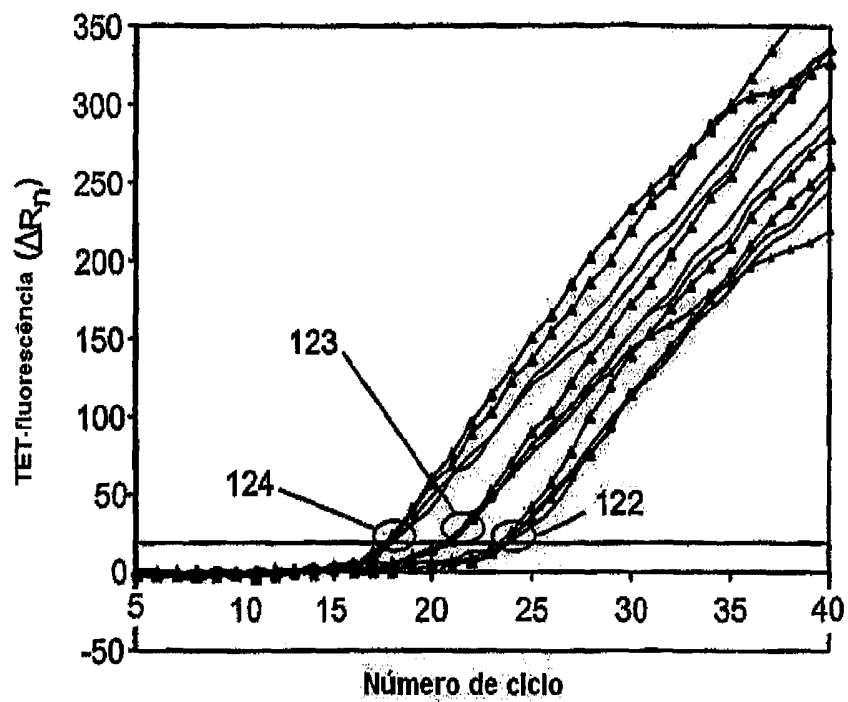


FIG. 12

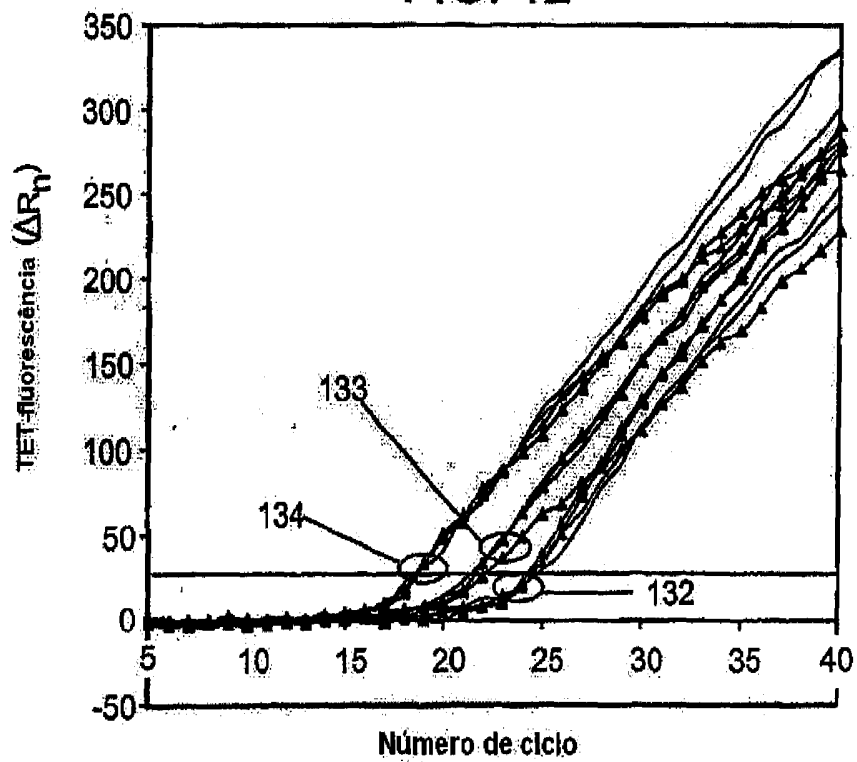


FIG. 13

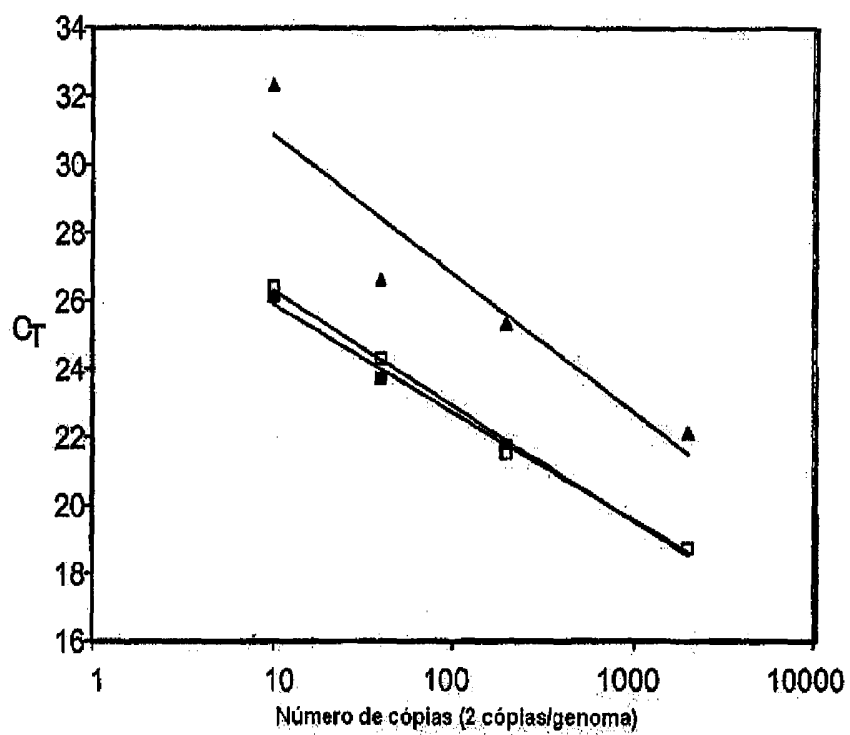


FIG. 14

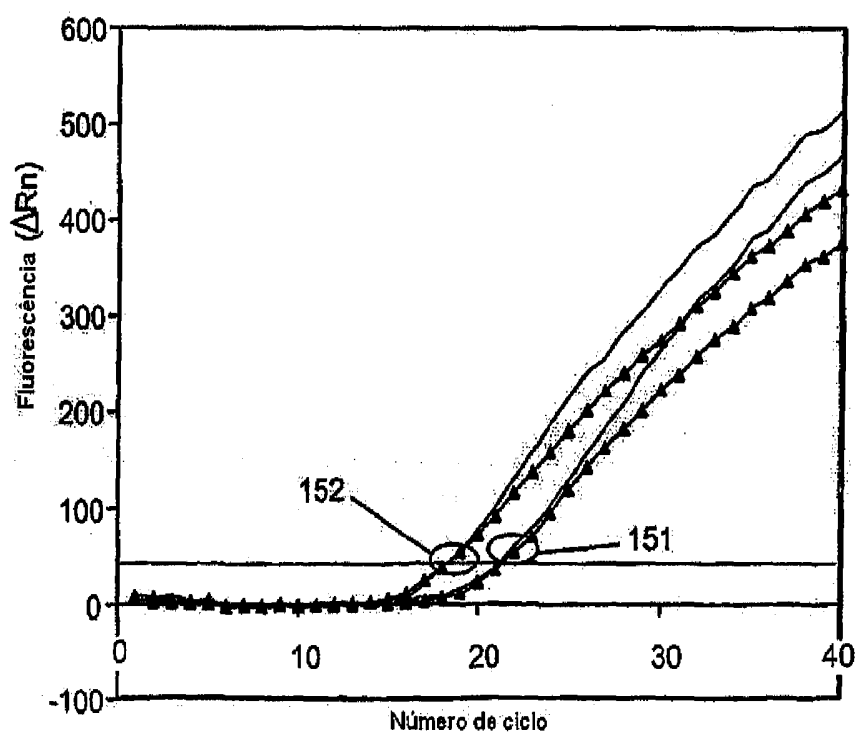


FIG 15



FIG. 16

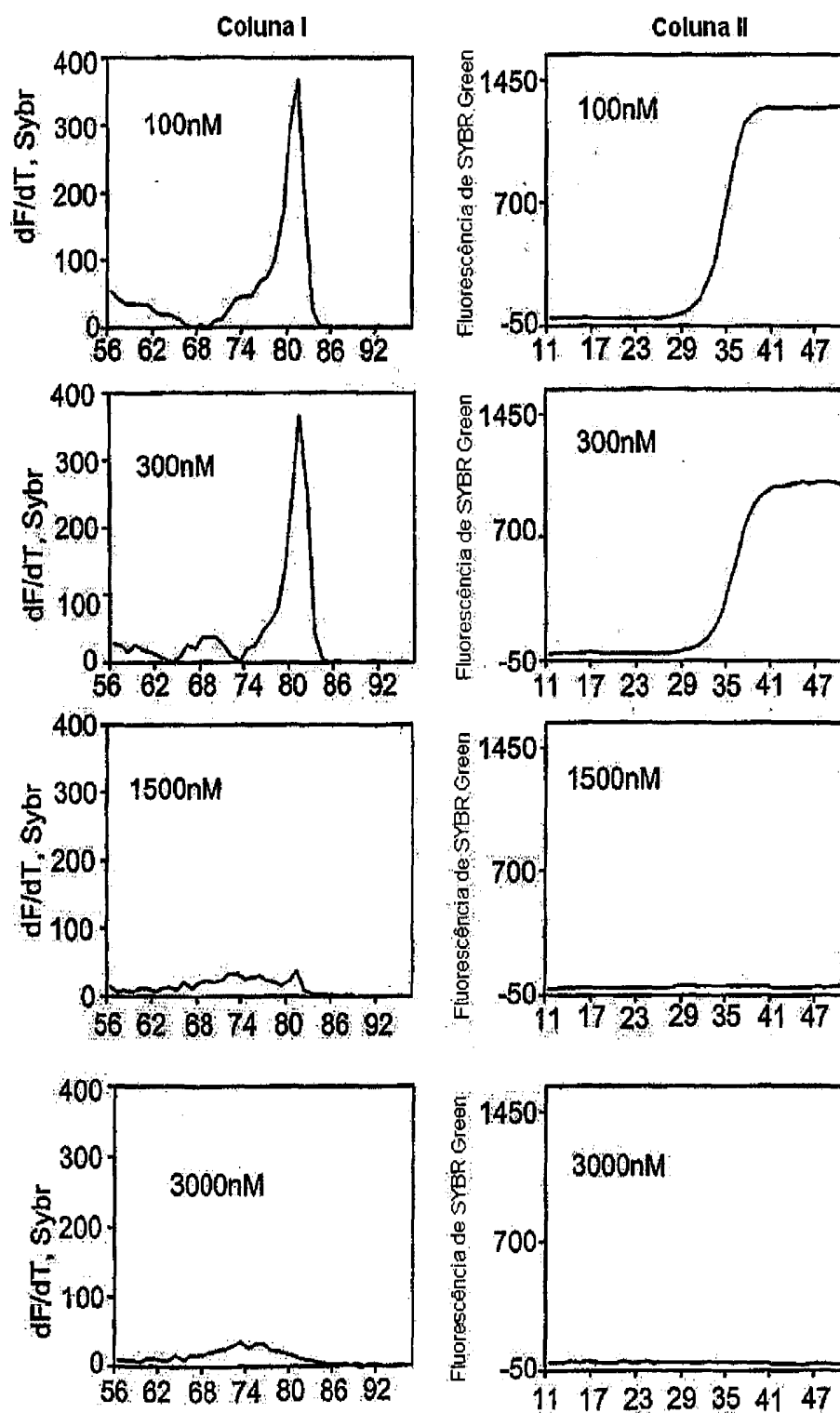


FIG. 17

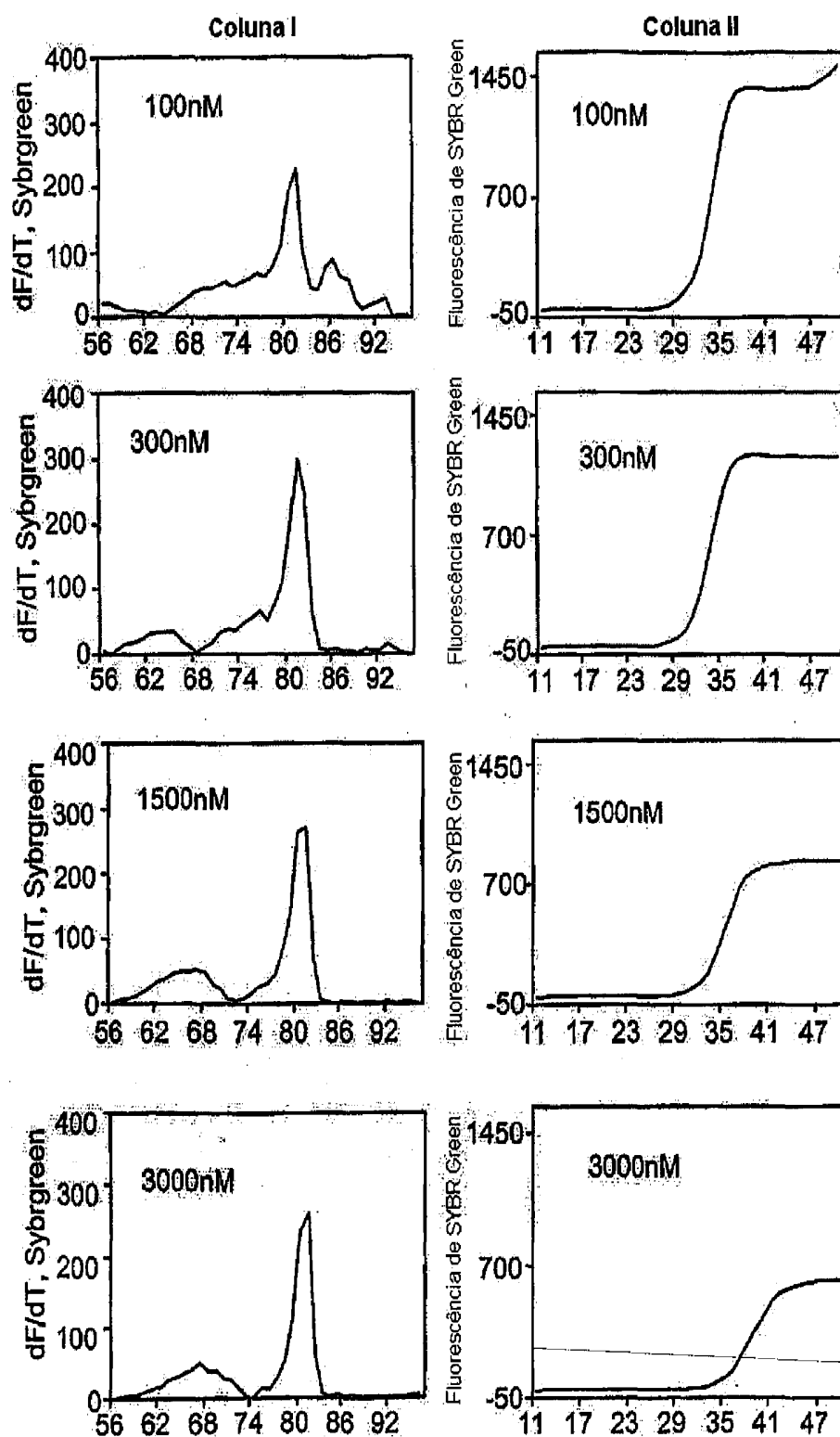


FIG. 18

**REAGENTES, KIT DE REAGENTES E CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS
PARA REALIZAÇÃO DE UMA AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE**

Um aditivo para prevenção de iniciação errônea em amplificações por reação em cadeia de polimerase (PCR) e ensaios compreendendo um oligonucleotídeo de hairpin tendo uma dupla de haste maior do que seis nucleotídeos de comprimento e um término de haste estabilizado. O aditivo melhora as amplificações por PCR, incluindo amplificações por LATE-PCR, quando adicionado às misturas de reação de amplificação iniciais. Ele pode ser incluído em conjuntos de oligonucleotídeo e em kits para amplificação e ensaios por PCR.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



FAF472A3A5E15421

Campo 2



A3525B0E88513ED1

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 0516619-5 Listagem de Sequência (título).txt
- Data de Geração do Código: 05-10-2015
- Hora de Geração do Código: 14:56:36
- Código de Controle:
 - Campo 1: FAF472A3A5E15421
 - Campo 2: A3525B0E88513ED1