



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 308 570**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05805383 .6**

⑨6 Fecha de presentación : **23.09.2005**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1794320**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

⑤4 Título: **Método para generar transcritos.**

③0 Prioridad: **01.10.2004 FR 04 52228**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

⑦3 Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR

⑦2 Inventor/es: **Mallet, François;**
Oriol, Guy y
Pichon, Jean-Philippe

⑦4 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para generar transcritos.

La presente invención se refiere a un método para la amplificación de secuencias diana de ácido nucleico.

A menudo es necesario, en las tecnologías relativas a los ácidos nucleicos y al material genético, determinar si un gen, una parte de un gen o una secuencia de nucleótidos está presente en un organismo vivo, un extracto celular de este organismo o cualquier otra muestra biológica. El interés de la búsqueda de secuencias de nucleótidos específicas es enorme, particularmente para la detección de organismos patógenos, la determinación de la presencia de alelos, la detección de la presencia de lesiones en un genoma hospedador y la detección de la presencia de un ARNm particular o de la modificación de un hospedador celular. De este modo pueden diagnosticarse muchas enfermedades genéticas mediante el análisis, e incluso la cuantificación, de la expresión de algunos genes. La cuantificación de la expresión de estos genes también es fundamental.

En la bibliografía se describen diferentes tipos de métodos de detección de ácidos nucleicos. Estos métodos, y particularmente los que requieren la detección de polinucleótidos, se basan en las propiedades de apareamiento de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos en los dúplex ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las bases adenina y timina (A-T) y las bases guanina y citosina (G-C) del ADN de doble cadena o también entre las bases adenina y uracilo (A-U) en los dúplex ADN-ARN o ARN-ARN. El apareamiento de cadenas de ácidos nucleicos se denomina comúnmente "hibridación de ácidos nucleicos" o simplemente "hibridación".

De manera general, después de identificar la secuencia específica de un organismo o de una enfermedad que debe analizarse, es conveniente extraer los ácidos nucleicos de una muestra y determinar si esta secuencia (también llamada "secuencia de interés") está presente. Se han desarrollado muchos métodos de detección con este fin.

El método más directo para detectar la presencia de una secuencia de interés en una muestra de ácidos nucleicos es obtener una "sonda" cuya secuencia sea lo suficientemente complementaria a una parte del ácido nucleico diana para hibridar con éste. La sonda sintetizada de este modo puede ponerse en presencia de una muestra que contenga ácidos nucleicos y, si la secuencia de interés está presente, la sonda hibridará y formará un producto de reacción. En ausencia de secuencia de interés y evitando cualquier fenómeno de hibridación no específica, no se formará ningún producto de reacción. Si la sonda sintetizada se acopla a un marcador detectable, el producto de reacción puede detectarse midiendo la cantidad de marcador presente. La transferencia de Southern (Southern E.M, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)) o Northern o la técnica Dot Blot o la hibridación sándwich (DUNN A.R. y HASSEL J.k, Cell, 12, 23 (1977)) constituyen ejemplos de métodos utilizables.

La principal dificultad de este enfoque es, sin embargo, que no es directamente aplicable a los casos en los que el número de copias de la secuencia de interés presente en una muestra es pequeño. En estas condiciones, es difícil distinguir una señal significativa superior al ruido de fondo de la reacción (es decir distinguir la fijación específica de una sonda a su secuencia de interés de la fijación no específica entre la sonda y una secuencia diferente de la secuencia de interés). Una de las soluciones a este problema consiste en aumentar la señal de detección mediante una reacción suplementaria. Como consecuencia, se han descrito diversos métodos para aumentar la potencia de detección de estas técnicas de hibridación. Estos métodos llamados de "amplificación" pueden clasificarse en tres categorías: amplificación de diana, de sonda o de señal. Los artículos de Lewis (1992, Genetic Engineering News 12: 1-9) por un lado y de Abramson y Myers (1993, Curer. Opus. Biotechnol. 4: 4147), por otro, constituyen buenas revisiones generales de estos métodos.

La amplificación de diana consiste en multiplicar de manera específica un fragmento de ácido nucleico presente en una muestra. Esta técnica permite aumentar considerablemente el número de copias de una secuencia nucleica diana a detectar.

Las técnicas de amplificación de diana descritas en la bibliografía se basan principalmente en la repetición de ciclos de síntesis de ADN *in vitro* mediante elongación de cebadores nucleotídicos hibridados en la secuencia diana a amplificar con una ADN polimerasa ("Reacción en cadena de la polimerasa", llamada PCR: véase las patentes US 4 683 195, US 4 683 202 y US 4 800 159; EP 201 184; el método llamado "Repair Chain Reaction" o RCR; véase solicitud de patente WO 90/01069; el método llamado de amplificación por desplazamiento de cadena o "Strand Displacement Amplification" (SDA); véase la patente EP O 497 272; el método de amplificación por desplazamiento de cadena utilizando una exonucleasa o "exonuclease-mediated strand displacement amplification": véase la patente EP 500 224) o en la repetición de ciclos de síntesis de ARN *in vitro*, mediante reacción de transcripción con ayuda de una ARN polimerasa.

Se han descrito varios de estos métodos de amplificación de diana basados en la amplificación de transcritos. El método llamado TAS, descrito en la solicitud de patente WO 88/10315, consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas. La primera etapa permite sintetizar un ADNc a partir de ARN en presencia de una transcriptasa inversa y de un cebador desoxinucleotídico que contiene una secuencia específica de promotor de ARN polimerasa fágica. Seguida de la desnaturalización térmica del heterodúplex ARN/ADNc, la hebra monocatenaria de ADNc es replicada por la transcriptasa inversa en presencia de un cebador oligonucleotídico anti-sentido. El homodúplex de ADN obtenido de

este modo durante esta segunda etapa contiene un promotor de doble cadena sobre el que puede fijarse una ARN polimerasa fágica dependiente de ADN. La tercera etapa es una transcripción, que conduce a la obtención de 30 a 1000 moléculas de ARN por matriz que, a su vez, podrán servir de matriz para la síntesis de ADNc y continuar así el ciclo de amplificación (DAVIS *et al.*, 1990. J. Infect. Dis. 162: 13-20).

Existen diferentes métodos derivados de la TAS, como la replicación de secuencia auto mantenida, llamada "Self-Sustained Sequence Replication" (o 3SR), descrita en la solicitud de patente WO 90/06995 y la patente EP O 373 960, el método llamado "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification" (o NASBA) descrito en la solicitud de patente WO 91/02818 y la patente europea EP 329 822 y el método de replicación de secuencia con ayuda de un solo cebador llamado "Single Primer Sequence Replication" (o SPSR) descrito en la patente US 5 194 370.

Estos métodos tienen en común la asociación de tres actividades enzimáticas: ADN polimerasa dependiente de ARN y de ADN (transcriptasa inversa), ribonucleasa H (ARNasa H, enzima de *Escherichia coli* y/o actividad enzimática asociada a la transcriptasa inversa) y ARN polimerasa dependiente de ADN (ARN polimerasa del bacteriófago T7). Estos métodos se basan en el mismo principio y se realizan a una temperatura fija (de 37 a 45°C), de acuerdo con un proceso continuo de reacciones de transcripción inversa y de transcripción para replicar una diana de ARN por medio de ADNc. Como en el caso de la TAS, se introduce un sitio de fijación de una ARN polimerasa (fago T7) en el ADNc mediante el cebador utilizado para la etapa de transcripción inversa. Sin embargo, la desnaturalización del heterodúplex ARN/ADNc se realiza de forma isotérmica mediante hidrólisis específica del ARN de este heterodúplex mediante actividad ARNasa H. A continuación el ADNc libre se replica a partir de un segundo cebador oligonucleotídico mediante la transcriptasa inversa. El homodúplex ADN/ADN se transcribe a ARN mediante la ARN polimerasa T7 y este ARN puede servir de nuevo como matriz para el siguiente ciclo.

Otro método, llamado "Ligation Activated Transcription" (o LAT) descrito en la patente US 5 194 370, utiliza las mismas actividades enzimáticas que los métodos 3SR, SPSR y NASBA y funciona en el mismo ciclo. Sin embargo, este método difiere en el modo de instalación de una secuencia promotora que en este caso se introduce en el extremo del ADNc mediante ligamiento de una estructura varilla-bucle que contiene el promotor, en presencia de una ADN ligasa.

También existen otros dos métodos de amplificación de diana basados en la amplificación de transcritos descritos en la solicitud de patente EP 369 775. Uno difiere de LAT únicamente por el hecho de que el promotor está constituido por dos oligonucleótidos distintos.

El otro utiliza dos actividades enzimáticas, una ligasa y una ARN polimerasa que reconocen un promotor de ADN de doble cadena, capaz de elongarse en la matriz de ARN. El promotor, llamado promotor móvil, está constituido por dos oligonucleótidos. Uno lleva una secuencia promotora sentido y una secuencia sonda que permite la hibridación con el extremo 3' de una diana de ARN, el otro lleva solamente una secuencia promotora anti-sentido. Por hibridación, el extremo 5' del oligonucleótido promotor anti-sentido se yuxtapone al extremo 3' de la diana y después se liga con este mismo extremo. La transcripción con la ARN polimerasa apropiada da como resultado la síntesis de múltiples transcritos. Estos transcritos se hibridan y se ligan a un segundo promotor móvil. La transcripción de la matriz de ARN da como resultado la síntesis de transcritos complementarios. El proceso puede repetirse, lo que conduce a una amplificación exponencial de la secuencia diana inicial.

También puede mencionarse el método descrito en la solicitud de patente WO 99/4385 que es un método de amplificación específica de ácidos nucleicos. Este método de amplificación también se basa en la transcripción pero solo necesita un único cebador. Éste, bloqueado en posición 3', permite la adición de una secuencia promotora T7 en posición 3' de un ARN sentido. Esta secuencia permite entonces la transcripción de ARNc anti-sentido. Este método no es específico ya que el cebador utilizado hibrida con la cola poliA de los ARNm.

De manera general, los métodos de amplificación tales como PCR o NASBA necesitan dos cebadores para la obtención de un amplicón. De ello resulta entonces que los propios productos de la reacción de amplificación se convierten en matrices para la amplificación, lo que hace a la amplificación de tipo exponencial. Aunque los métodos permiten obtener muy buenos rendimientos de amplificación, siguen estando mal adaptados para la amplificación simultánea de varias dianas (hablamos de la amplificación en múltiplex), etapa sin embargo indispensable cuando se quiere analizar un perfil de expresión de varios genes. Además, el método descrito en la solicitud WO 99/4385 se basa en la amplificación del conjunto de los ARNm, lo que puede contribuir a producir ruido de fondo durante un análisis en chip de ADN. Además, este método se limita a la región 3' de los genes. Por lo tanto, este método está mal adaptado para el estudio de una mutación o de una región diana situadas en medio del gen o en su región 5'.

La presente invención se propone resolver el conjunto de inconvenientes del estado de la técnica presentando un método de amplificación específico, lineal, que permite amplificar simultáneamente regiones diana de diferentes genes, pudiendo situarse dichas regiones diana en posición 3', 5' o en medio del gen.

Para ello, la invención se refiere a un método para generar transcritos a partir

- de una secuencia de ARN a amplificar que comprende una región "cebador" y una región de interés y

• de un cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región “cebador” de la secuencia de ARN a amplificar,

realizándose dicho método a temperatura constante y comprendiendo las siguientes etapas:

- a) se hibrida dicho cebador con el ARN a amplificar,
- b) se elonga el cebador mediante una actividad enzimática de transcriptasa inversa para generar una secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN a amplificar,
- c) se corta el ARN a amplificar, hibrida con dicho ADNc, mediante una enzima que tiene una actividad ribonucleasa H, para obtener fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con dicho ADNc,
- d) se elongan los extremos de dichos fragmentos de ARN a amplificar con una enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener híbridos ARN-ADN/ADN
- e) se obtienen transcritos de ARN a partir de los híbridos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) con una enzima que tiene una actividad ARN polimerasa.

En la presente invención, se entiende por *transcrito* un producto de transcripción, es decir un ARN neosintetizado durante la transcripción de la matriz bajo la dependencia del promotor que ha iniciado la transcripción.

Se entiende por *secuencia*, una secuencia de nucleótidos que contiene las bases naturales (A, C, G, T si es una secuencia de naturaleza desoxirribonucleotídica, A, C, G, U si es una secuencia de naturaleza ribonucleotídica) natural y/o una o más bases modificadas, tales como inosina, metil-5-desoxicitidina, desoxiuridina, dimetilamino-5-desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualesquiera bases modificadas que permitan una reacción de hibridación. La secuencia de polinucleótidos también puede estar modificada a nivel de los enlaces internucleotídicos (que pueden implicar por ejemplo enlaces fosforotioato, H-fosfonato, alquil fosfonato) o a nivel del esqueleto como es el caso por ejemplo para los alfa-oligonucleótidos (patente francesa N° 2 607 507) o PNA (EGHOLM *et al.*, 1992, J. Am. Chem. Soc. 1141895-1987). En una secuencia polinucleotídica modificada, pueden estar presentes varias modificaciones tales como las indicadas anteriormente en combinación. Esta secuencia puede ser de naturaleza ADN, ARN o de naturaleza química ADN/ARN y posee generalmente una “longitud” de al menos 5 desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos, pudiendo contener opcionalmente al menos un nucleótido modificado. Una secuencia puede contener diferentes regiones, cada una asociada a diferentes funciones.

Para realizar el método de acuerdo con la invención, se parte de una secuencia de ARN a amplificar, que podría calificarse de primer modelo de *ARN a amplificar*. En la presente invención, el ARN a amplificar puede ser una secuencia cualquiera de ácido ribonucleico. Preferiblemente, el ARN a amplificar es un ARN mensajero.

El ARN a amplificar comprende particularmente una *región de interés*, es decir un polinucleótido que puede hibridar con una sonda de hibridación, específica de dicha región de interés. De este modo, esta sonda permite, tal como se describe a continuación, la detección de la presencia o la ausencia de la región de interés.

Este ARN a amplificar comprende también una *región “cebador”*, es decir un polinucleótido sobre el que puede hibridar específicamente un cebador de amplificación tal como se define a continuación. Preferiblemente, la región “cebador” se sitúa en la región 3’ de la región de interés de la secuencia de ARN a amplificar.

Por *secuencia o región capaz de hibridar con otra secuencia/región*, se entiende una secuencia o una región que puede hibridar con otra secuencia/región en condiciones de hibridación, que pueden determinarse en cada caso de forma conocida. También se habla de secuencias/regiones complementarias. Una secuencia o región estrictamente complementaria de otra es una secuencia en la que cada una de las bases puede emparejarse con una base de la otra secuencia, sin emparejamiento erróneo. Por *hibridación*, se entiende el proceso durante el cual, en las condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos, que tienen secuencias suficientemente complementarias pueden formar una doble cadena con puentes de hidrógeno estables y específicos. Las condiciones de hibridación vienen determinadas por la rigurosidad, es decir el rigor de las condiciones operatorias. La hibridación es tanto más específica cuanto a mayor rigurosidad se realiza. La rigurosidad se define particularmente en función de la composición de bases de un dúplex sonda/diana, así como por el grado de emparejamiento erróneo entre dos ácidos nucleicos.

La rigurosidad también puede estar en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturizantes y/o la temperatura de hibridación. La rigurosidad de las condiciones en las que debe realizarse una reacción de hibridación dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el especialista en la técnica.

ES 2 308 570 T3

En la presente invención, se entiende por *cebador de amplificación* una secuencia que, cuando hibrida con un ácido nucleico (de naturaleza ADN o ARN) a amplificar, permite iniciar una reacción de elongación. El cebador utilizado en la presente invención puede dividirse en 2 regiones, que son, en sentido 5'-3':

• una región promotora, que puede ser reconocida por una ARN polimerasa para iniciar la transcripción, es decir la síntesis de un ARN. Esta región promotora comprende un promotor y un sitio de iniciación de la transcripción por una ARN polimerasa. Esta región promotora comprende particularmente una de las cadenas de un promotor de una ARN polimerasa. Como ejemplo, pueden mencionarse los promotores naturales de las ARN polimerasas, secuencias acortadas derivadas de los promotores naturales y que han conservado su funcionalidad o también las estructuras en forma de "bucles" capaces de iniciar la transcripción, tales como las descritas en el documento MOLLEGAARD N.E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3892-3895. Esta región promotora puede comprender también una secuencia favorable a la iniciación de la transcripción, cuya función es limitar la formación de transcritos abortivos. La ARN polimerasa puede ser dependiente de ADN, lo que permite la transcripción de un ARN a partir de una secuencia de ADN.

• una región capaz de hibridar con la región "cebador" del ARN a amplificar, es decir complementaria de dicha región "cebador" del ARN a amplificar. Esta región puede ser de naturaleza ADN.

De este modo, el extremo 5' del cebador puede comprender nucleótidos que no hibridan con dicho ARN a amplificar (secuencia anti-sentido de un promotor, secuencia anti-sentido de un sitio de iniciación de la transcripción...), mientras que el extremo 3' debe tener una longitud y una composición de nucleótidos que permita la iniciación de la elongación del cebador, en condiciones de temperatura y de rigurosidad apropiadas. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el cebador es de naturaleza ADN. El cebador no está bloqueado en posición 3', lo que permite establecer el híbrido ADN-ARN.

El método de acuerdo con la invención es un método isotérmico, es decir que no necesita cambio de temperatura en el transcurso de las diferentes etapas. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el método se realiza a una temperatura comprendida entre 37°C y 50°C, preferiblemente entre 40 y 45°C y aún más preferiblemente a 41°C.

Durante la etapa a), se hibrida dicho cebador con el ARN a amplificar a nivel de dicha región que permite la hibridación cebador/secuencia de ARN a amplificar. Esta hibridación se realiza por complementariedad de una región predeterminada del ARN a amplificar con una región predeterminada del cebador, en condiciones de rigurosidad y de temperatura apropiadas. De acuerdo con una realización preferida de la invención, esta etapa está precedida de una etapa de desnaturalización del ARN a amplificar, preferiblemente a 65°C.

Durante la etapa b), se elonga el cebador mediante una actividad enzimática de transcriptasa inversa (también llamada reverse transcriptase) para generar una secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN a amplificar. Esta etapa necesita la presencia de desoxirribonucleótidos, que son utilizados por la enzima para la síntesis por complementariedad del ADNc. Esta elongación se realiza en sentido 5'-3' del cebador, en condiciones de rigurosidad y temperatura apropiadas, comparables a las de la etapa a). Esta enzima transcriptasa inversa es preferiblemente la transcriptasa inversa AMV.

Durante la etapa c), se corta el ARN hibridado en dicho ADNc con una enzima que tiene actividad ARNasa H, para obtener fragmentos de ARN hibridados en dicho ADNc. La actividad ARNasa H permite la hidrólisis de los híbridos ARN-ADN, mientras que no hidroliza los híbridos ARN-ARN o ADN. La actividad ARNasa H puede obtenerse mediante una enzima diferente, tal como particularmente por la enzima ARNasa H de *E. coli* o mediante la actividad ARNasa H de una enzima transcriptasa inversa tal como transcriptasa inversa AMV.

Durante la etapa d), se elongan los extremos de dichos fragmentos de ARN con una enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener complejos ARN-ADN/ADN. Esta enzima transcriptasa inversa es preferiblemente la transcriptasa inversa AMV.

Durante la etapa e), se obtienen transcritos de ARN a partir de los complejos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) mediante una enzima que tiene actividad ARN polimerasa. La transcripción se realiza mediante síntesis, en sentido 5'-3', de un ARN anti-paralelo y complementario de la cadena de nucleótidos transcrita.

La enzima que tiene una actividad ARN polimerasa que se utiliza es una enzima capaz de unirse al promotor del cebador y de iniciar *in vitro* la síntesis de ARN a partir del sitio de iniciación de la transcripción del cebador. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la enzima que tiene actividad ARN polimerasa es una ARN polimerasa de bacteriófago, preferiblemente ARN polimerasa del bacteriófago T7, pero pueden utilizarse otras polimerasas tales como ARN polimerasa de los bacteriófagos T3, SP6, gh-1... Por supuesto, la secuencia promotora situada en el cebador debe adaptarse a la ARN polimerasa utilizada durante la etapa e).

El método de amplificación de acuerdo con la invención puede desarrollarse mediante la adición, en condiciones apropiadas, de todos los compuestos necesarios para su realización, es decir el ARN a amplificar, las enzimas, el ceba-

dor de amplificación y los desoxirribonucleótidos. Este medio de reacción está libre de agentes que pueden interferir con el proceso de amplificación, tales como las sustancias que podrían inhibir la actividad de las enzimas necesarias, que podrían interferir con la hibridación del cebador con el ARN a amplificar o que podrían degradar los productos amplificados.

De este modo, de acuerdo con una realización preferida de la invención, se realizan las etapas a) a e) durante un tiempo suficiente para obtener un número suficiente de transcritos. Preferiblemente, se realizan las etapas a) a e) durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 3 h 30 min. y aún más preferiblemente entre 1 h 30 min. y 2 h 30 min.

Los transcritos obtenidos de este modo pueden detectarse a continuación mediante cualquiera de las técnicas conocidas por el especialista en la técnica.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el método para generar transcritos de acuerdo con la invención comprende además la siguiente etapa:

f) se utiliza una sonda de hibridación específica de dicha región de interés para detectar los transcritos de ARN generados.

Por *detección*, se entiende una detección directa mediante un método físico, o un método de detección con ayuda de un marcador. Existen muchos métodos de detección para la detección de los ácidos nucleicos [Véase por ejemplo el documento Kricka *et al.*, Clinical Chemistry, 1999, N° 45(4), p. 453-458 o Keller G.H. *et al.*, DNA Probes, 2° Ed., Stockton Press, 1993, secciones 5 y 6, págs. 173-259]. Por *marcador*, se entiende un trazador capaz de generar una señal. Una lista no limitante de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, como la peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes o colorantes; los grupos con densidad electrónica detectables mediante microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas como la conductividad, mediante métodos de amperimetría o de voltimetría o mediante mediciones de impedancia; los grupos detectables mediante los métodos ópticos como difracción, resonancia del plasmón superficial, variación del ángulo de contacto o mediante métodos físicos como espectroscopía de fuerza atómica, el efecto túnel, etc; moléculas radiactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I . De este modo, el polinucleótido puede marcarse durante la etapa de amplificación de acuerdo con la invención, por ejemplo utilizando un nucleótido trifosfato marcado para la reacción de amplificación. También pueden utilizarse sistemas indirectos, como por ejemplo ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Los pares ligando/anti-ligando los conoce bien el especialista en la técnica, como es el caso por ejemplo de los siguientes pares: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectinas, polinucleótido/complementario del polinucleótido, secuencia sucesiva de histidina, llamada "tag", para un metal, por ejemplo níquel. En este caso, es el ligando el que lleva el agente de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser él mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

El nucleótido marcado será un ribonucleótido. El polinucleótido también puede marcarse después de la etapa de amplificación, por ejemplo hibridando una sonda marcada de acuerdo con la técnica de hibridación sándwich descrita en el documento WO-A-91/19812. Dichas sondas también pueden utilizarse en una técnica OLISA, tal como se describe en la solicitud WO 03/098217.

Esta detección también puede realizarse mediante la utilización de sondas de hibridación que reconocen dichas regiones de interés de los ARN amplificados de acuerdo con la invención. Por *sonda de hibridación*, se entiende un fragmento de nucleótidos que comprende de 5 a 100 motivos de nucleótidos, particularmente de 6 a 35 motivos de nucleótidos, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con una región de interés. Esta sonda de hibridación puede ser una *sonda llamada de captura*. En este caso, el fragmento nucleotídico diana puede marcarse previamente por medio de un marcador. La sonda llamada de captura es inmovilizada o inmovilizable en un soporte sólido mediante cualquier medio apropiado, es decir directa o indirectamente, por ejemplo mediante covalencia o adsorción. A continuación se realiza una reacción de hibridación entre dicha sonda y el fragmento nucleotídico diana marcado.

La sonda de hibridación también puede ser una *sonda llamada de detección*. En este caso, la sonda de hibridación puede marcarse por medio de un marcador. A continuación se realiza una reacción de hibridación entre dicha sonda de detección y el fragmento nucleotídico diana. Un ensayo sándwich también puede emplear una sonda de captura fijada en un soporte sólido, en el que se hibrida el fragmento nucleotídico diana, en el que se hibrida la sonda de detección.

Ya se utilice una sonda llamada de captura o una sonda llamada de detección, la *reacción de hibridación* puede realizarse sobre un soporte sólido que incluye todos los materiales sobre los que puede inmovilizarse un ácido nucleico. Pueden utilizarse materiales de síntesis o materiales naturales, opcionalmente modificados químicamente, como soporte sólido, particularmente polisacáridos tales como materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa o dextrano, polímeros, copolímeros, particularmente a base de monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como algodón y fibras sintéticas tales como nylon; materiales minerales tales como sílice, cuarzo, vidrios, cerámicas; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microtitulación, de membrana como la descrita en la solicitud

WO-A-94/12670, de una partícula o de un biochip. Por *biochip*, se entiende un soporte sólido de dimensión reducida donde se fijan una multitud de sondas de captura en posiciones predeterminadas. El concepto de biochip, más exactamente de chip de ADN, data del inicio de los años 90. En la actualidad, este concepto se amplía ya que comienzan a desarrollarse chips de proteínas. Se basa en una tecnología multidisciplinar que integra micro-electrónica, química de los ácidos nucleicos, análisis de imágenes e informática. El principio de funcionamiento se basa en el fundamento de la biología molecular; el fenómeno de hibridación, es decir el emparejamiento mediante complementariedad de las bases de dos secuencias de ADN y/o de ARN.

El método de los biochips se basa en el empleo de sondas de captura fijadas en un soporte sólido sobre las que se hace actuar una muestra de fragmentos nucleotídicos diana marcados directa o indirectamente con fluoró cromos. Las sondas de captura se posicionan de manera específica en el soporte o chip y cada hibridación da una información particular, en relación con el fragmento nucleotídico diana. Las informaciones obtenidas son acumulativas y permiten por ejemplo cuantificar el nivel de expresión de un gen o de varios genes diana. Para analizar la expresión de un gen diana, puede realizarse entonces un biochip que lleve muchas sondas que correspondan a todo o a parte del gen diana, que se transcribe a ARNm. A continuación se hibridan por ejemplo los ADN complementarios de los ARNm obtenidos del o de los genes diana que se desea analizar. Después de la hibridación, el soporte o chip se limpia, se lee por ejemplo con un escáner y el análisis de la fluorescencia se trata informáticamente. Pueden mencionarse a título indicativo, los chips de ADN puestos a punto por la compañía Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays", M. Chee *et al.*, Science, 1996, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis" A. Caviani Pease *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026), para los diagnósticos moleculares. En esta tecnología, las sondas de captura son generalmente de tamaño reducido, aproximadamente veinte nucleótidos. Otros ejemplos de biochips se dan en las publicaciones de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, N° 16, págs. 40-44; F. Ginot, Human Mutation, 1997, N°10; págs. 1-10; J. Chang *et al.*, Molecular diagnosis, 1996, N°1 (3), págs. 183-200; T. Livache *et al.*, Nucleic Acid Research, 1994, N° 22(15), págs. 2915-2921; J. Cheng *et al.*, Nature Biotechnology, 1998, N°16, págs. 541-546 o en las patentes US-A-4.981.783, US-A-5.700.637, US-A-5.445.934, US-A-5.744.305 y US-A-5.807.522. También pueden mencionarse los chips de baja densidad desarrollados por la compañía Apibio tales como los descritos en la solicitud WO 03/098217. La característica principal del soporte sólido debe ser conservar las características de hibridación de las sondas de captura en los fragmentos nucleotídicos diana mientras genera un ruido de fondo mínimo para el método de detección. La presente invención está particularmente adaptada a estos sistemas de chips de baja densidad.

El método de acuerdo con la invención puede realizarse para generar transcritos de ARN procedentes de diferentes genes. Ésta es también una de las ventajas de la presente invención que permite amplificar simultáneamente regiones diana de diferentes genes, pudiendo localizarse dichas regiones diana en posición 3', 5' o en medio del gen.

Para ello, la invención también se refiere a un método para generar transcritos a partir

- de al menos una primera secuencia de ARN a amplificar que comprende una región "cebador" y una región de interés y de un primer cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región "cebador" de la primera secuencia de ARN a amplificar,

- de al menos una segunda secuencia de ARN a amplificar, diferente de dicha primera secuencia de ARN a amplificar y que comprende una región "cebador" y una región de interés y de un segundo cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región "cebador" de la segunda secuencia de ARN a amplificar,

realizándose dicho método a temperatura constante y comprendiendo las siguientes etapas:

- a) se hibridan dichos primero y segundo cebadores con dichos primer y segundo ARN a amplificar
- b) se elongan dichos primero y segundo cebadores mediante una actividad enzimática de transcriptasa inversa para generar una primera secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del primer ARN a amplificar y una segunda secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del segundo ARN a amplificar,
- c) se cortan los primer y segundo ARN a amplificar, hibridados respectivamente en el primer y segundo ADNc, mediante una enzima que tiene una actividad ribonucleasa H, para obtener los primeros fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con el primer ADNc y los segundos fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con el segundo ADNc
- d) se elongan los extremos de dichos primer y segundo fragmentos de ARN a amplificar mediante una enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener híbridos ARN-ADN/ADN
- e) se obtienen transcritos de dichos primer y segundo ARN a amplificar, a partir de los híbridos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) mediante una enzima que tiene actividad ARN polimerasa.

ES 2 308 570 T3

Este método puede aplicarse de manera comparable para generar transcritos a partir de ARN a amplificar procedente de 3, 4, 5, 10 o más genes diferentes. Las etapas a) a e) se realizan de forma comparable a las descritas anteriormente y se realizan durante un tiempo suficiente para obtener un número suficiente de transcritos, como se ha definido anteriormente.

Para la detección de los transcritos, se utiliza preferiblemente, durante una etapa f), una primera sonda de hibridación para detectar los transcritos del primer ARN a amplificar y una segunda sonda de hibridación para detectar los transcritos del segundo ARN a amplificar.

Preferiblemente, y como se ha definido anteriormente, la enzima que tiene actividad ARN polimerasa es una ARN polimerasa de bacteriófago y aún más preferiblemente, la ARN polimerasa del bacteriófago T7.

Las figuras adjuntas se dan a modo de ejemplos explicativos y no tienen ningún carácter limitante. Las figuras permitirán entender mejor la invención.

La figura 1 representa esquemáticamente las etapas del método de acuerdo con la invención.

La figura 2 representa la señal emitida por una sonda de hibridación hibridada con los transcritos obtenidos de acuerdo con la invención y tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 3 representa la regresión lineal obtenida después de la amplificación de una gama de transcritos (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} copias) de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 3.

La figura 4 representa la señal emitida (media de 3 réplicas) y su desviación típica a nivel de cada sonda específica después de la hibridación y revelado de los productos de amplificaciones obtenidas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 4.

En la figura 1, se representan las secuencias de naturaleza ribonucleica en trazo ondulado, mientras que las secuencias de naturaleza desoxirribonucleica se representan en trazo recto.

Durante la etapa a), se hibrida el cebador de naturaleza ADN (representado por un trazo en línea punteada larga) en la región "cebador" (representada en negrita) del ARN matriz, la secuencia promotora en posición 5' del cebador que no hibrida en el ARN matriz. Para entender mejor la invención, la secuencia de interés que se desea detectar después de la fase de amplificación se representa en línea punteada corta, del lado 5' de la región "cebador". Sin embargo, la secuencia de interés y la secuencia "cebador" pueden ser una única y misma secuencia.

Se hace actuar, durante la etapa b), una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa (RT), para elongar, en sentido 5'-3', el cebador hibridado con el ARN matriz. Se obtiene un ADN (ADNc, representado en línea punteada) cuya secuencia es complementaria a la del ARN matriz. De este modo se obtiene, entre la región diana y el extremo 5' del ARN matriz, una secuencia híbrida de doble cadena ARN matriz/ADNc. Debido a su falta de complementariedad, la secuencia promotora del cebador y la secuencia situada en el lado 3' de la región diana del ARN diana siguen siendo secuencias no hibridadas (cadena sencilla).

Se hace actuar, durante la etapa c), una enzima que tiene una actividad ARNasa H para inducir cortes en el ARN matriz. Estos cortes no son específicos y permiten liberar el extremo 3' OH (representado mediante una cruz) de fragmentos de ARN, hibridados con el ADNc.

Los extremos 3' OH liberados de este modo se elongan durante la etapa d) mediante una enzima que tiene actividad transcriptasa inversa y actividad de desplazamiento de cadena. La elongación termina en la síntesis de la cadena complementaria de la secuencia promotora del cebador. De este modo, se obtienen diferentes secuencias híbridas de doble cadena ARN-ADN/ADN, que comprenden una región promotora de doble cadena (representada mediante un círculo), capaz, bajo la acción de una ARN polimerasa dependiente de ADN, de iniciar una transcripción. De este modo, a título indicativo se representan dos híbridos diferentes, obtenidos a partir de dos sitios de corte diferentes.

La acción de una enzima ARN polimerasa dependiente de ADN permite obtener, durante la etapa e) transcritos de ARN correspondientes a los diferentes híbridos obtenidos durante la etapa d). De este modo se obtiene una población de transcritos, de tamaño diferente pero que todos comprenden la región de interés que se desea detectar.

Los siguientes ejemplos se dan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitante, estos ejemplos permitirán entender mejor la invención.

ES 2 308 570 T3

Ejemplo 1

Obtención de secuencias de ARN a amplificar

5 Una primera secuencia de ARN a amplificar, correspondiente a la SEC ID N° 1:

```
10 GUCACUGUCA AGCCUCCAGA UGCCAUCCCU UUGACUUGAA AACUCAGCCA
    GUUUGGGUGG AUCAGUGGCC GCUCCCCAAA AAUAAGCUGG AGGCGCUCCA
    UAAUUUAGUC CUGGAACAGU UAGAAUUGGG ACACAUUGAG GAAUCUUUCU
    CUCCAUGGAA UUCACUUGUC UUUGUUAUCC AAAAGAAAUUC UGGGGAAAAC
15 AGAGAAUGCU CACUCAUCUU AGGGCAGUUA AUGCUGUACU UCAACCUCUG
    GGGACAUUAC AAUCUGGCUU ACCCUCCCGC UCUAUGCUCG CUGAGUAUUG
    GCCUCUAAUC CUCAUAGAUC UUAAGAUUG CUUUUUUAAC AUUCCACUGG
20 CCUCUCAGGA CUUUGAAAAG UUUGCUUUUA UGGUCCCUUC CCUCAACAAU
    GUCGCUCAGG CUACAUGCUA CUAUUGGAAA GUCCUACCAC AAGGCAUGCU
    UAAUAGUCCC ACUAUUUGUC AGUAUUUUGU GGGGCGUGUG CUUCAACCUG
25 UCAGGGAUCA GUUCCCCGA UGUUACAUCG UUCACUACAU GGAUGAUCUC
    CUCUGCACAG CCCCCCAUA CACCAUUUUG AUUUCUGCU UUUCUGUGAU
30 UCAACAGGCC AUUUCAGAAG CAGGUUUGAC UAUUGCACCA GAAAAAUUC
    AAACUACCUC UCAUUUUCAA UAUUUGGGCA UGCAGUUGGA AGACAAGCUG
    AUUACACCAC AAAAAGUJCA GCUUAGGAGA GACGCCU
35
```

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HML-4 en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

45 (Secuencia pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una segunda secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 2:

```
5      GGCCAAGAGA UAAGACCAG CUCUGGCUAA GCGGUGGCCA AGAGUGUGGG
      CGGAAGACAA CCCUCCAGGG UUGGCAGUCA ACCAAGCCCC CGUGCUUAUA
      GAAGUUAAGC CUGGGGUCCA GCCGGUUAAG CAAAAACAGU ACCCGGUCCU
10     CAGAGAAGCU CUUGAAGGUA UCCAGGUCCA UCUCAGUGC CUAAGAACCU
      UUAGAAUUAU AGUUCUUGU CAGUCUCCAU GGAACACUCC CCUCCUGCCU
      GUUCCCAAGC CUGGGACCAA GGACUACAGG CCGGUACAGG AUUUGCGCUU
15     GGUUAAUCAG GCUACAGUGA CUUUACAUC AACAGUACCU AACCUGUACA
      CAUUGCUGGG GUUGCUGCCA GCUGAGGACA GCUGGUUCAC CUGCUUGGAC
20     CUGAAAGAUG CCUUCUUUAG CAUCAGAUUA GCCCCUGAGA GACAGAAGCU
      GUUUGCCUUU CAGUGGGAAG AUCCAGAGUC AGGUGUCACU ACUCAAUACA
      CUUGGACCCA GCCUCCCCAA AGGUUCAAGA ACUCCCCCAC CAUCUUUGGG
25     GAGGCGUUGG CUCGAGACCU CCAGAAGUUU CCCACCAGAG ACCUAGGCUG
      CGUGUUGCUC CAGUACGUUG AUGACCUUUU GCUGGGACAC CCCACGGCAG
30     UCGGGUGCGC CAAGGGAACA GAUGCUCUAC UCCGGCACCU GGAGGACUGU
      GGGUUAUAGG UGUCCAAGAA AAAAAGCUCA GAUCUGCCGA CAGCAGGUAU
      GUUACUUGGG AUUUACUAUC CAACAGGGGG AGCACAGCCU GGAUCAGAA
35     AGAAAGCAGG UCAUUUGUAA UCUACCGGAG CCUAAGACCA GAAGGCAGGU
      GAGAGAAU
```

40 se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HERV-E4.1.

45 Ejemplo 2

Generación de transcritos mediante el método de acuerdo con la invención a partir de secuencias de ARN tales como se han definido en el ejemplo 1

50 Para la amplificación de la secuencia de ARN de SEC ID N° 1, se utilizaba una secuencia cebador de SEC ID N° 3: SEC ID N° 3: **TAATACGACT CACTATAGGG AGATCTAGCA GCATAGGGGG GGCTGTGCAG AGGAGATCAT**CC que comprende

55 • una región promotora que comprende un promotor de la T7 ARN polimerasa (indicado en cursiva en la SEC ID N° 3) y un sitio de iniciación de la transcripción (indicado en negrita en la SEC ID N° 3)

• una región capaz de hibridar en una región cebador de la secuencia de ARN a amplificar (indicada subrayada en la SEC ID N° 3).

60 Este cebador no estaba bloqueado en posición 3'.

Nótese que la región capaz de hibridar con la región cebador puede ser más corta y comprende particularmente de 15 a 30 pares de bases: Nótese también que entre el sitio de iniciación y la región capaz de hibridar con la región cebador, está comprendida una secuencia que favorece la iniciación, que limita la formación de transcritos abortivos.

ES 2 308 570 T3

Para la amplificación de la secuencia de ARN de SEC ID N° 2, se utilizaba una secuencia cebador de SEC ID N° 4: TAATACGACT CACTATAGGG AGATCTAGCA GCATACAGCA AAAGGTCATC AACGTACTGG AG que comprende

- una región promotora que comprende un promotor de la T7 ARN polimerasa (indicado en cursiva en la SEC ID N° 4) y un sitio de iniciación de la transcripción (indicado en negrita en la SEC ID N° 4)
- una región capaz de hibridar con una región cebador de la secuencia de ARN a amplificar (indicada subrayada en la SEC ID N° 4).

Este cebador no estaba bloqueado en posición 3'.

Nótese que la región capaz de hibridar con la región cebador puede ser más corta y comprende particularmente de 15 a 30 pares de bases. Nótese también que entre el sitio de iniciación y la región capaz de hibridar con la región cebador, está comprendida una secuencia que favorece la iniciación, que limita la formación de transcritos abortivos.

La generación de transcritos se realizaba en una mezcla de reacción (NucliSens Basic Kit biMérieux) que comprende una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa, (AMV-RT), una enzima que tiene actividad ARNasa H (ARNasa H) y una enzima que tiene actividad ARN polimerasa (T7 ARN polimerasa).

La amplificación se realiza en presencia de:

- la secuencia cebador de SEC ID N° 3 (0,5 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 1,
- la secuencia cebador de SEC ID N° 4 (0,5 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 2,
- la secuencia cebador de SEC ID N° 3 (0,5 μ M) y la secuencia cebador de SEC ID N° 4 (0,5 μ M) para amplificar simultáneamente la secuencia de ARN de SEC ID N° 1 y la secuencia de ARN de SEC ID N° 2.

De este modo, se realizaba la amplificación de las secuencias de ARN SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, con la incorporación de biotina:

- independientemente una de otra:

Para ello, una cantidad conocida de ARN de SEC ID N° 1 o de ARN de SEC ID N° 2 en solución acuosa (1 x 10⁹ o 1 x 10¹⁰ copias en 5 μ l de H₂O) se mezcla con 10 μ l de mezcla de reacción (NucliSens Basic Kit) a la que previamente se le ha añadido UTP-biotina (0,6 mM) y el cebador que permite la amplificación de la SEC ID N° 1 o de la SEC ID N° 2.

- simultáneamente:

Para ello, una cantidad conocida de ARN de SEC ID N° 1 y de ARN de SEC ID N° 2 en solución acuosa se han mezclado con 10 μ l de mezcla de reacción (NucliSens Basic Kit) a la que previamente se le ha añadido UTP-biotina y los cebadores que permiten la amplificación de la SEC ID N° 1 y de la SEC ID N° 2.

Para cada una de las reacciones de amplificación, el volumen resultante era de 15 μ l (csp H₂O sin nucleasa). La mezcla se incubaba a continuación 5 minutos a 65°C y después 5 minutos a 41°C para permitir la hibridación del cebador con el ARN a amplificar.

A continuación se añadía un volumen de 5 μ l de mezcla enzimática (NucliSens Basic Kit). La mezcla de un volumen de 20 μ l se incubaba 90 minutos a 41°C para permitir

1) la hibridación del cebador con el ARN a amplificar

2) la elongación del cebador mediante la actividad enzimática de transcriptasa inversa para generar una secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN a amplificar.

3) el corte del ARN a amplificar, hibridado con dicho ADNc, mediante la enzima que tiene la actividad ribonucleasa H, para obtener fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con dicho ADNc,

4) la elongación de los extremos de dichos fragmentos de ARN a amplificar mediante la enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener híbridos ARN-ADN/ADN

5) la obtención de los transcritos de ARN a partir de los híbridos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) con la enzima que tiene una actividad ARN polimerasa.

ES 2 308 570 T3

Los transcritos de ARN obtenidos se han analizado mediante el método ELOSA (Mallet F. y col. 1993). Este método permite la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos mediante la hibridación de éstos con sondas oligonucleotídicas (llamadas sondas de detección) injertadas en el fondo de pocillos de placas de microtitulación.

5 La sonda que permitía la detección de la SEC ID N° 1 era la secuencia SEC ID N° 5: CAACCTGTCAGCCAT CAGTTTC

La sonda que permitía la detección de la SEC ID N° 2 era la secuencia SEC ID N° 6: CTCGAGACCTCCA GAAGTTTCC

10

El marcado de los transcritos de ARN con biotina permitía la revelación de la hibridación gracias a la acción de un conjugado de estreptavidina-enzima y del sustrato correspondiente y las DO se leían mediante espectrometría. La DO era proporcional a la cantidad de transcritos generados mediante el método de acuerdo con la invención.

15

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1. Las letras A a D correspondían a condiciones de amplificación de las SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 independientemente una de otra (A: 1×10^9 copias de SEC ID N° 1; B: 1×10^9 copias de SEC ID N° 2; C: 1×10^{10} copias de SEC ID N° 1; D: 1×10^{10} copias de SEC ID N° 2), mientras que las letras E a H correspondían a amplificaciones de las SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 simultáneamente (E: 1×10^9 copias de SEC ID N° 1 y 1×10^9 copias de SEC ID N° 2; F: 1×10^{10} copias de SEC ID N° 1 y 1×10^{10} copias de SEC ID N° 2; G: 1×10^9 copias de SEC ID N° 1 y 1×10^{10} copias de SEC ID N° 2; H: 1×10^{10} copias de SEC ID N° 1 y 1×10^9 copias de SEC ID N° 2). Los transcritos obtenidos se detectaban mediante la presencia de una sonda de detección de SEC ID N° 5 (columnas grises) o mediante la presencia de una sonda de detección de SEC ID N° 6 (columnas negras).

20

Los resultados mostraban que las señales detectadas eran comparables entre las amplificaciones independientes y las amplificaciones realizadas en dúplex.

25

De este modo, el número de transcritos generados era comparable, ya tuviera el ARN a amplificar una SEC ID N° 1 o una SEC ID N° 2 (la DO leída era comparable durante la amplificación de acuerdo con la condición A y la condición B). Además, el número de transcritos generados era mayor cuando la cantidad de ARN a amplificar aumentaba (la DO leída era inferior durante la amplificación de acuerdo con la condición A que de acuerdo con la condición C; análogamente, la DO leída era inferior durante la amplificación de acuerdo con la condición B que de acuerdo con la condición D).

30

Finalmente, el número de transcritos generados durante la amplificación simultánea de las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 era comparable al número de transcritos generados durante la amplificación de las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 independientemente una de otra. Incluso cuando la amplificación simultánea se realizaba en cantidades de transcritos que difieran en un log, las señales siguen siendo idénticas a las obtenidas durante la amplificación de las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 independientemente una de otra.

35

Se obtenían resultados comparables mediante el análisis de los tratamientos generados en un chip OLISA. Los chips OLISA son chips de ADN de baja densidad (hasta 128 sondas por chip) dispuestos en un formato convencional de placa de 96 pocillos. Las sondas de detección oligonucleotídicas, distribuidas en corona, se injertan en el fondo de los pocillos. La revelación colorimétrica de los híbridos sonda/diana se realiza con ayuda de un conjugado de estreptavidina-enzima que implica un marcado con biotina de la diana.

40

Una etapa suplementaria de digestión suplementaria con ARNasa confirmaba que el producto detectado es un ARNc.

45

Estos resultados demuestran que el método de acuerdo con la invención está por lo tanto particularmente adaptado a la amplificación de transcritos con vistas a su análisis cuantitativo en chip de ADN. En efecto, el hecho de que este método sea transcripcional y que los productos de amplificación no se vuelvan nunca matrices para la amplificación, otorga a esta amplificación un carácter lineal perfectamente adaptado a una cuantificación en biochip de los transcritos.

50

Experimento 3

55

Evaluación de la linealidad de la amplificación del método de acuerdo con la invención

Este ejemplo se realizó a partir de la SEC ID N° 2 utilizada como secuencia ARN a amplificar y la SEC ID N° 4 utilizada como cebador de amplificación.

60

El método para generar los transcritos se realiza de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 2. En este caso, el cebador de SEC ID N° 2 se utiliza a una concentración de $0,5 \mu\text{M}$. Se amplifica una gama de transcritos (1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10}) y los productos de la reacción se analizan en un chip OLISA con ayuda de la sonda SEC ID N° 6, de acuerdo con un principio comparable al desarrollado en el ejemplo 2.

65

La regresión lineal realizada a partir de las medias obtenidas para al menos 4 mediciones de cada punto conduce a la obtención de una recta de coeficiente de correlación $R^2 = 0,9781$, tal como se presenta en la figura 3. Por lo tanto, esto atestigua la linealidad de la amplificación del método de acuerdo con la invención.

ES 2 308 570 T3

Experimento 4

Amplificación en múltiplex

- 5 Para este experimento, el protocolo de amplificación se ha realizado como se ha descrito anteriormente en los ejemplos 1 y 2.

De este modo, una primera secuencia de ARN a amplificar, correspondiente a la SEC ID N° 7:

```

10      CACUGUAGAG      CCUCCUAAAC      CCAUACCAUU      AACUUGGAAA
      ACAGAAAAAC      UGGUGUGGGU      AAAUCAGUGG      CCACUACCAA
15      AACAAAAACU      GGAGGCUUUA      CAUUUAUUAG      CAAAUAGAACA
      GUUAGAAAAG      GGUCAUAUUG      AGCCUUCAUU      CUCGCCUUGG
      AAUUCUCCUG      UGUUUGUAAU      UCAGAAGAAA      UCAGGCAAAU
20      GGCAUAUGUU      AACUGACUUA      AGGGUCGUAA      ACGCCGUAAU
      UCAACCCAUG      GGGCCUCUCC      AACCCGGGUU      GCCCUCUCCG
25      GCCAUGAUCC      CAAAAGAUUG      GCCUUUAGUU      AUAAUUGAUC
      UAAAGGAUUG      CUUUUUUACC      AUCCCUCUGG      CGGAGCAGGA
30      UUGCGAAAAA      UUUGCCUUUA      CUAUACCAGC      CAUAAAUAAU
      AAAGAACCAG      CCACCAGGUU      UCAGUGGAAA      UUGUUACCUC
      AGGGAAUGCU      UAAUAGUCCA      ACUAUUUGUC      AGACUUUUGU
35      AGGUCGAGCU      CUUCAACCAG      UUAGAGACAA      GUUUUCAGAC
      UGUUAUAUUA      UUCAUUUAU      UGAUGAUUU      UUAUGUGCUA
40      CAGAAACGAG      AGAUAAAUUA      AUUGACUGUU      AUACAUUUCU
      GCAAGCAGAG      GUUGCCAAUG      CAGGACUGGC      AAUAGCAUCU
      GAUAAGAUGC      AAACCUCUAC      UCCUUUUCAU      UAUUUAGGGA
45      UGCAGAUAGA      AAAUAGAAAA      AUUAAGCCAC      AAAAAAUAGA
      AAUAAGAAAA      GACACAUUAA      AAACACUAAA      UGAUUUUCAA
50      AAUUGCUGG      GAGAUUUUAA      UUGGAUUCGG      CCAACUCUAG
      GCAUUCCUAC      UUAUGCCAUG      UCAAAUUU

```

- 55 se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HML-2 en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

60

65

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una segunda secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 8:

5	UAUCCAAUUU	GGGUAGACCA	GUGGCCUUUA	AAGGGAGAGA
	AAUUGCAAAG	AGCCCAUGAG	UUUGUUGAAG	AGCAAUUA
	AGCCAGCCAU	AUAGAACCAU	CAAAAAGACC	UUGGAAUUCA
10	CCCAUUUUCA	UCAUUCCTAA	AAAGUCUGGU	AAAUAGAGAC
	UUUUGCAUGA	CUAACAUGCU	AUCAAUGCUA	AUUUGAAACC
15	UAUGGGACCC	CUUGAGCAGG	UGUUCUCCUC	CCCUUCAGUG
	AUUCUUGAG	AUUGGCAUUA	AAUAGUUUUU	GGCUUAAAAU
	ACUGCAUUUG	UACUAUUCCT	UUUGCAGAAC	AGGACAGAGA
20	AAAAUUUGUG	UUUAUAAUAC	CAGCUAUAAA	UAACGAAAGG
	CCAGCUCCCC	GAUUUCACUG	GAAAGUGCUU	CCUGAAGGGA
25	UGCUGAACAG	UCCUACCAUG	UGUCAGUAUC	AUGUAAAUCA
	AGCUUUGCUC	CUCAGUAGAA	AAGAAUUUCC	UAAUUGCAAG
30	ACUAUUCUUU	UUUUGGAUGA	UAUUUUACUA	GCAGCCCCAA
	UGGAUCCAGC	ACUUUUUAGU	UUUUGUGCCU	CUGUUGUAAA
	GAAUACACAG	UUUAGAGGUU	UAAUCAUAGC	ACCUGAAAAA
35	GUACAGAUGU	CCUCUCCUUG	GAAAUUUCUU	GGGUACAUAC
	UAACUUCGUG	GUCAGUAAGA	CCUCAAAGG	UUAAAUUAAA
40	UACUAGCAAC	UUACACACCU	UAAUUGAUUA	UCAGAAAUUA
	CUAGGCAAUA	UUUACUGGCU	UUUCCCCACC	UUUGGCAUAA
45	CUACUGAUAA	GUUACAGAAC	CUGUUUUUCU	UCUUAAAAGA
	CAAUGCUGCU	CUAGACUCUC	CCAGGUUUUU	AACUCCUGCA
50	GCACAAAGGG AAUUGAGGA AGUAGAGCAC			

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HML-5 en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una tercera secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 9:

5	CACCCUUACC	CUGCUCAAUG	CCAAUAUCCC	AUCCCACAGC
	AUGCUUUAAA	AGGAUUAAAG	CCUGUUAUCA	CUCGCCUGCU
	ACAGCAUGGG	CUUCUAGAAC	CUAUAAACUC	UCUUUUCAAU
10	UCCCCCAUUU	UACCUGUCCA	AAAACCGGAU	AAGUCUUACA
	GACUAGUUCA	GAAUCUGCGU	CUUAUCAACC	AAAUUGUUUU
15	GCCUAUCCAC	CCUGUGGUGC	CCAACCUGUA	CACUCUUUUG
	UCCUCAAUAC	CUUCCUCCAC	AACUCACUAU	UCCGUGCUUG
	AUCUUAAGA	UGGUUUUUUC	ACUAUUCUCC	UGCACUCCUC
20	GUCCCAGCCU	CUCUUUGCUU	UCACCUGGAC	UGACCCUGAC
	ACCAUCAGU	CCCAGCAGCU	UACCUGGACU	GUGCUGCCGC
25	AAGGUUUCAG	GGACAGCCCU	CGUUACUUCA	GCCAAGCUCU
	UUCUCAUGAU	CUACUUUCCU	UCCACCCUC	CGCUUCUCAC
30	CUUAUUCAAU	AUAUUGAUGA	GCUUCUUCUU	UGUAGCCCCU
	CCUUUGAAUC	UUCUCAAUAA	GACACACUUC	UGCUCUUA
	GCAUUUAUUC	UCCAAAGGAU	AUCGGGUUUC	CCCCUCCAAA
35	GCUCAAAUUU	CUUCUCCAUC	CGUUACCUAC	CUCGGCAUAA
	UUCUUCAUAA	GAACACACGU	GCUCUCCCUG	CCGACCGUGU
40	CUGACUAAUC	UCUCAAGCCC	CAACCCCUUC	UACAAAACAA
	CAACUCCUUU	CCUUCUGGG	CGUGGUUGGA	UACUUUCGCC
45	UUUGGAUACC	UGGUUUUGCC	AUCCUAACAA	AACCAUUAUA
	UAAACUCACA	AAAGGAAACU	UAGCUGACCC	CAUAGAUCU
50	AAAUCCUUUC CCCACUCCUC UUUCUG			

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HERV-H en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una cuarta secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 10:

5	CUGAAGCUCU	UAAAGGAUUA	CAGGAUAUUG	UUAAACAUUU
	AAAAGCUCAA	GGCUUAGUAA	GGAAAUGCAG	CAGUCCCUGC
	AACACCCCAA	UUCUAGGAGU	ACAAAAACCA	AAUGGUCACU
10	GGAGACUAGU	GCAAGAUCUU	AGACUCAUCA	AUGAGGCAGU
	AAUUCCUCUA	UAUCCAGUUG	UACCCAACCC	CUAUACCCUG
15	CUUUCUCAA	UACCAGAGGA	AGCAGAAUGG	UUCAUGGUUC
	UGGACCUCAA	GGAUGCCUUC	UUCUGUUUCC	CCUGCACUCU
	GACUCCCAGU	UUCUGUUUGC	CUUUGAGGAU	CCCACAGACC
20	ACACGUCCCA	ACUUACAUGG	AUGGUCUUGC	CACAAGGGUU
	UAGGGAUAGC	CCUCACCUGU	UUGGUCAGGC	ACUGGCCCAA
25	GAUCUAGGCC	ACUUCUCAAG	UCCAGGCACU	UUGGUCCUUC
	AGUAUGUGGA	UGAUUUACUU	UUGGCUACCA	GUUCAGAAGC
30	CUCAUGCCAG	CAGGCUACUC	UAGAUCUCUU	GAACUUUCUA
	CCUAAUCAAG	GGUACAAGGC	AUCUAGGUCA	AAGGUGCAGC
	UUUGCUUACA	GCAGGCUAAA	UAUCUAGGCC	UAAUCUUAGC
35	CAGAGGGACC	AGGGCCCUCA	GCAAGGAAUG	AAUACAGCCU
	AUACUGGCUU	AUCCUUGCCC	UAAGACAUAU	AAACAGUUGC
40	AGGGGUUCCU	UGGAAUCACC	GGCUUUUGCC	GACUAUGGAU
	CCCUGGAUAC	AGUGAGAUAG	UCAGGCCCCU	CCAUACUCUA
45	AUCAAGGAGA CCC			

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno ERV-9 en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

55

60

65

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una quinta secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 11:

5	GACCCAAGGC	CCAACAAGGA	CUCCAAAAGA	UUGUUAAGGA
	CCUAAAAGCC	CAAGGCCUAG	UAAAACCAUG	CAGUAACCCC
10	UGCAGUACUC	CAAUUUUAGG	AGUACAGAAA	CCCAACAGAC
	AGUGGAGGUU	AGUGCAAGAU	CUCAGGAUUA	UCAAUGAGGC
15	UGUUGUUCCU	CUAUAGCCAG	CUGUACCUAG	CCCUUAUACU
	CUGCUUUCCC	AAAUACCAGA	GGAAGCAGAG	UGGUUUACAG
	UCCUGGACCU	UCAGGAUGCC	UUCUUCUGCA	UCCCUGUACA
20	UCCUGACUCU	CAAUUCUUGU	UUGCCUUUGA	AGAUACUUCA
	AACCCAACAU	CUCAACUCAC	CUGGACUUUU	UACCCCAAGG
25	UUCAGGGUAU	GUCCCCAUCU	AUUUGCCAGG	CAUUAGCCCA
	AGACUUGAGC	CAAUCCUCAU	ACCUGGACAC	UUGUCUUCGG
	UAGGUGGAUG	AUUUACUUUU	GGCCGCCCAU	UCAGAAACCU
30	UGUGCCAUCA	AGCCACCCAA	GCGCUCUUCA	AUUUCCUCGC
	UACCUUGUGGC	UACAUGGUUU	CCAAACCAAA	GGCUCAACUC
35	UGCUCACAGC	AGGUUACUUA	GGGCUAAAAU	UAUCCAAAGG
	CACCAGGGCC	CUCAGUGAGG	AACACAUCCA	GCCUAUACUG
40	GCUUAUCCUC	AUCCCAAAAC	CCUAAAGCAA	CUAAGGGGGAU
	UCCUUGGCGU	AAUAGGUUUC	UGCCGAAAAU	GGAUUCCCAG
45	GUAUGGCGAA	AUAGCCAGGU	CAUUAAAUAC	ACUAAUUAAG
	GAAACUCAGA	AAGCCAAUAC	CCAUUUAGUA	AGAUGGACAA
	CUGAAGUAGA	AGUGG		

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HERV-W en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una sexta secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 12:

5	AUCAUAAUCC	AAUGCCAGUC	ACCCUGGAAC	ACUCCACUUU
	UGCUGGUACA	AAAACCAUUG	CCUGGACCAG	GAUCUGAUGA
	GUAUAUACUG	GUGCAGGGCU	UGCAUGCUGU	AAACCAAGCC
10	ACGGUGACCA	UACAUCCAGU	AGUACCAAAC	CUGUAUACUU
	UAAUGGGACU	UAUUCUAGCA	AGUGCCACCU	GGUUUACAGU
15	CCUGGACUUA	AAGGAUGCUU	UCCUCUGUCU	CUACCUGGCA
	CCAGUUAGUC	AGCCCAUCUU	UGCAUUUUAA	UGGGACAAUU
20	CAGUCACAGG	CACAGGGGGA	CAGCUCGCCU	GGACUAGUCU
	CCCACAAGGG	UUCAAGAAUU	CUCCCACAAU	CUUUGGGGAA
	GCACUGGCCU	CAGACCUCAA	GGCAUACACC	CCACCAA AUG
25	ACAACUGCGC	CUUGUUGCAG	UACAUAGACA	ACCCUUCUUU
	UGGCAGCCCC	AACCCCAAGA	GGACUGU AAC	UGGGGGAACC
30	CAGGACCUCC	UCCAUCUCUU	AUGGGAAAGC	AGGGUAUAGA
	GUAUCCAAAA	AGAAGGCCCA	AAUUUGCCAU	GAAAAGGUUA
35	AAUAUUUAGG	CUUCAUAGUA	AGCCAAGGGG	AACGCUGGCU
	UGGCCAUGGA	UGAAAGCAAG	CCAUUUGUGC	ACUCCAACU
	CCAACCACCU	GGCGCCAAAU	AGGGGAAUUC	UUAGGGGCAG
40	CAGGGUUCUG	CCAU AUCUGG	AUCCCAA AUU	UCUCACUUAU
	AGCCAGGCCC	UUAUAUGAAG	CCACAAGGGA	GGGUGAAAAG
45	GAACCCCUCC	UCUGAAAGGC	UGACCAGAAG	AAGGUGUUUA
	AACAAAUCAA	AGAAGCUCUA	ACUCAGGCUC	CAGCCUUAGG
50	ACUGCCAGAU	ACUACU		

se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HERV-R en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

ES 2 308 570 T3

De manera comparable, una séptima secuencia de ARN a amplificar, de SEC ID N° 13:

5	UUA AUGGAGU	UAUGGCUCAG	GUCUGACUUA	CAGCAGGUCC
	AGUGGGUCCC	UGGACUCAUC	CUGUGUUCAU	UUUCCCAGUG
	CCAGAAUGCA	UAAUUGGCAU	UGUCAUACUU	AGAGGCUGGC
10	AGAACCCCCA	CAUUGAUUCU	GUGACUGGUA	AGGUGAGGGC
	UAUUAUGGUG	GGAAAGGCCA	AAUGGAAGCC	AUUGGAGCUG
15	CCUUUACCUA	GGAAAAUAGU	AAAUCAAAAA	CAUUAUCACC
	ACCCUGGAGG	GAUUGCAGAG	AUUAGUGCCA	CCAUCAAGGA
	CUUGAAAAAU	GCAGGGGUGG	CGAUUCCCAU	AACAUCCUUG
20	UUCAACUCUC	CUUUUUGGCC	UGUGCAGAAG	ACAGAUGGAU
	CUUGGAGAAU	GAGAGUGGAU	UAUCAUAAGC	UUAACCAAGU
25	GGUGACUCCA	AUUGCAGCUG	CUAUACAAGA	UGUGGUUUUC
	AUUGCUC AAG	CAAAUUA AUA	CAUCUCCUGG	UACCUUGUAU
30	GCAGCCAUUG	ACUUGGCAA	UGGCCUUUUA	CCCAUUCCA
	AAGCCCCACC	AGAAGCGAUU	UGCCUUCAGC	UGGCAAGGCC
	AGCAAUGUAU	CUUUACUGUC	CUACUUCAGG	GGUAUAUCAA
35	CUCUCCGGCU	UUGUGUCAUA	AUCUUAUUCA	GAGUGAUCUU
	GAUCACUUUU	CACUGCCACA	AGAU AUCACA	CUGGUCCA AU
40	ACAUUGAUGG	CAUUAUGUUG	AUUGGAUCCA	AUGAGCAAGA
	AGUAGCAAAC	ACACUGGACU	UAUUGGUGAG	ACAUUUGCAU
45	GCCAUAAGGAU	GGGAAAUAAA	UCCAAAUAAA	AUUCACGCAC
	CCUCUACCUC	AGUAAAAUU		

50 se ha producido a partir de secuencias clonadas obtenidas de una región del gen *pol* del retrovirus endógeno HERV-L en un vector Dual promoter pCR-II-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. La transcripción se ha realizado con ayuda del Kit Ampliscribe T7 Flash (Epicentre) de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor.

55 La amplificación se ha realizado, como se ha descrito en el ejemplo 2, en presencia de:

- la secuencia cebador de SEC ID N° 14 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACA CATAAAATAT CAT CAACATA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 7,
- 60 • la secuencia cebador de SEC ID N° 15 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGATG CAGAGGAGAT CATCCATGTA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 1,
- la secuencia cebador de SEC ID N° 16 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACT AGTAAAATAT CATC CATAAA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 8,
- 65 • la secuencia cebador de SEC ID N° 17 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAAA AGTAGAAGGT CATCAATATA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 9,

ES 2 308 570 T3

• la secuencia cebador de SEC ID N° 18 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAAG TAAATCATCC ACA TACTGAA G (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 10,

5 • la secuencia cebador de SEC ID N° 19 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAAA GTAAATCATC CACGTACCGA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 11,

• la secuencia cebador de SEC ID N° 20 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC AGCAAAAGGT CATCAACGTA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 2,

10 • la secuencia cebador de SEC ID N° 21 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC AAAAGAAGGT TGTCTATGTA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 12,

• la secuencia cebador de SEC ID N° 22 AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGATC ARCATAATGY CAT CAATGTA (0,75 μ M) para amplificar la secuencia de ARN de SEC ID N° 13.

15

Los transcritos de ARN obtenidos se han analizado en un chip OLISA tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

20 La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 1 era la secuencia SEC ID N° 5: CAACCTGTCAGGGAT CAGTTTC

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 2 era la secuencia SEC ID N° 6: CTCGAGACCTCCA GAAGTTTCC

25 La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 7 era la secuencia SEC ID N° 23: CAACCAGTTA GAGA CAAGTT TTCA

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 8 era la secuencia SEC ID N° 24: TTGCTCCCCA GTA GAAAAGA ATT

30

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 9 era la secuencia SEC ID N° 25: GACAGCCCCC ATTACTT CAG TCAAG

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 10 era la secuencia SEC ID N° 26: CCAAGATCTA GGC CACTTCT CA

35

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 11 era la secuencia SEC ID N° 27: CATCTATTTG GCCAGG CATT A

40 La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 12 era la secuencia SEC ID N° 28: AGACCTCAAGGCATA CACCC

La sonda que permite la detección de la SEC ID N° 13 era la secuencia SEC ID N° 29: GCTITGTGTC ATAATCT TAT TCG

45

Las medias y desviaciones típicas se calculan a partir de cuatro amplificaciones independientes y se presentan en la figura 4.

50 La técnica de acuerdo con la invención permite amplificar transcritos en mezcla (en este documento, hasta 9 diferentes). Se constata, además, que existe una relación lineal entre la señal medida y la cantidad de transcritos introducida en el volumen de reacción en la gama ensayada (de 10^6 a 10^8 copias para cada transcrito). Esto indica que esta técnica permite amplificar simultáneamente y de manera específica varios transcritos. De este modo, el análisis en chip de ADN (o mediante otro método) de productos de amplificación obtenidos mediante este método podría permitir una cuantificación de transcritos de la muestra inicial.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para generar transcritos a partir

- de al menos una secuencia de ARN a amplificar que comprende una región “cebador” y una región de interés y
- de un cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región “cebador” de la secuencia de ARN a amplificar,

realizándose dicho método a temperatura constante y comprendiendo las siguientes etapas:

- a) se hibrida dicho cebador con el ARN a amplificar,
- b) se elonga el cebador mediante una actividad enzimática de transcriptasa inversa para generar una secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN a amplificar,
- c) se corta el ARN a amplificar, hibridado con dicho ADNc, mediante una enzima que tiene una actividad ribonucleasa H, para obtener fragmentos de ARN a amplificar hibridados con dicho ADNc,
- d) se elongan los extremos de dichos fragmentos de ARN a amplificar con una enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener híbridos ARN-ADN/ADN
- e) se obtienen transcritos de ARN a partir de los híbridos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) con una enzima que tiene una actividad ARN polimerasa.

2. Método para generar transcritos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la siguiente etapa:

- f) se utiliza una sonda de hibridación específica de dicha región de interés para detectar los transcritos de ARN generados.

3. Método para generar transcritos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, de acuerdo con el cual se realizan las etapas a) a e) durante un tiempo suficiente para obtener un número suficiente de transcritos.

4. Método para generar transcritos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima que tiene una actividad ARN polimerasa es una ARN polimerasa de bacteriófago, preferiblemente ARN polimerasa del bacteriófago T7.

5. Método para generar transcritos a partir

- de al menos una primera secuencia de ARN a amplificar que comprende una región “cebador” y una región de interés y de un primer cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región “cebador” de la primera secuencia de ARN a amplificar,
- de al menos una segunda secuencia de ARN a amplificar, diferente de dicha primera secuencia de ARN a amplificar y que comprende una región “cebador” y una región de interés y de un segundo cebador de amplificación que comprende una región promotora y una región capaz de hibridar con dicha región “cebador” de la segunda secuencia de ARN a amplificar,

realizándose dicho método a temperatura constante y comprendiendo las siguientes etapas:

- a) se hibridan dichos primero y segundo cebadores con dichos primer y segundo ARN a amplificar
- b) se elongan dichos primero y segundo cebadores mediante una actividad enzimática de transcriptasa inversa para generar una primera secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del primer ARN a amplificar y una segunda secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del segundo ARN a amplificar,
- c) se cortan los primer y segundo ARN a amplificar, hibridados respectivamente con el primer y segundo ADNc, mediante una enzima que tiene una actividad ribonucleasa H, para obtener los primeros fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con el primer ADNc y los segundos fragmentos de ARN a amplificar, hibridados con el segundo ADNc
- d) se elongan los extremos de dichos primer y segundo fragmentos de ARN a amplificar mediante una enzima transcriptasa inversa y de desplazamiento de cadena, para obtener híbridos ARN-ADN/ADN
- e) se obtienen transcritos de dichos primer y segundo ARN a amplificar, a partir de los híbridos ARN-ADN/ADN formados durante la etapa d) mediante una enzima que tiene actividad ARN polimerasa.

ES 2 308 570 T3

6. Método para generar transcritos de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además la siguiente etapa:

- f) se utiliza una primera sonda de hibridación para detectar los transcritos del primer ARN a amplificar y una segunda sonda de hibridación para detectar los transcritos del segundo ARN a amplificar.

5

7. Método para generar transcritos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, de acuerdo con el cual se realizan las etapas a) a e) durante un tiempo suficiente para obtener un número suficiente de transcritos.

10 8. Método para generar transcritos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la enzima que tiene una actividad ARN polimerasa es una ARN polimerasa de bacteriófago, preferiblemente ARN polimerasa del bacteriófago T7.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

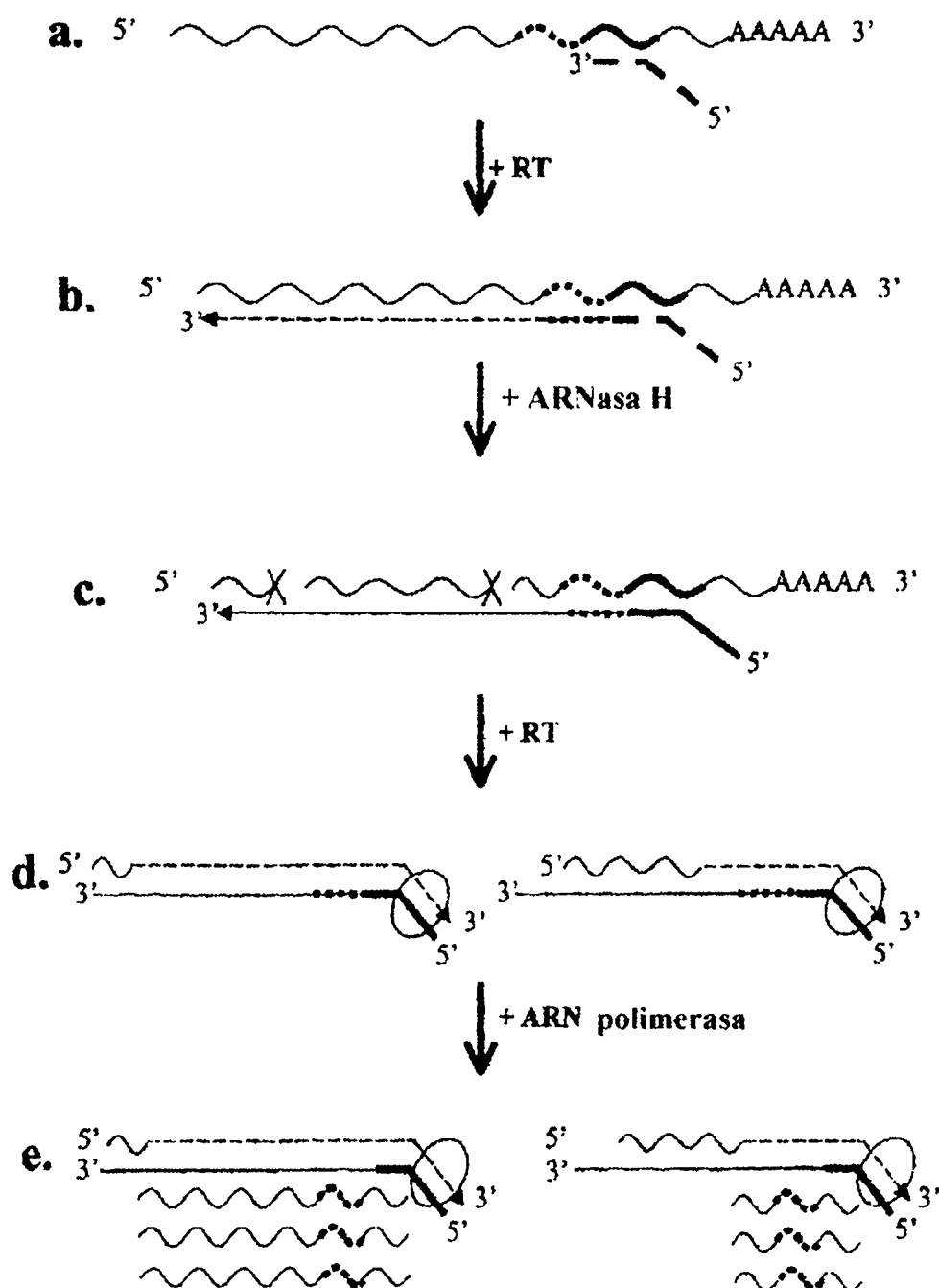


FIGURA 1

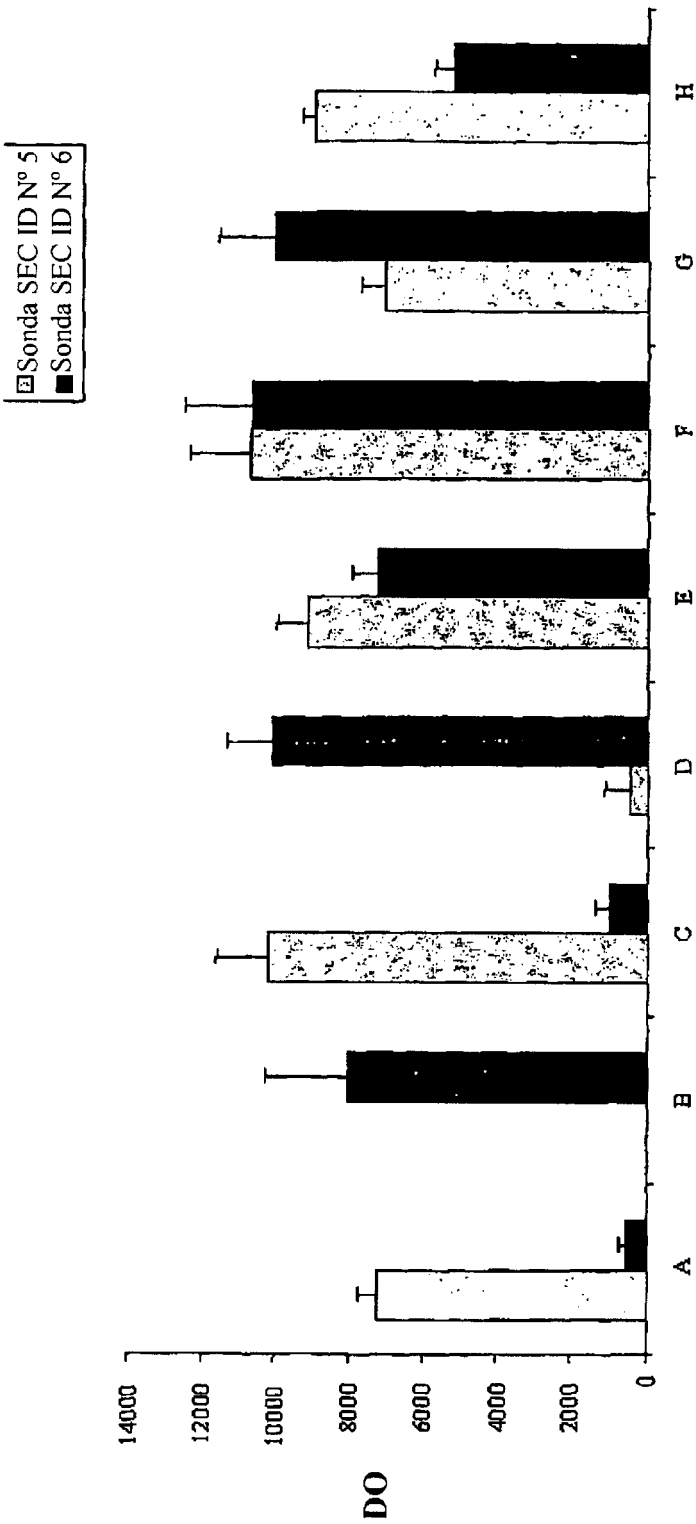


FIGURA 2

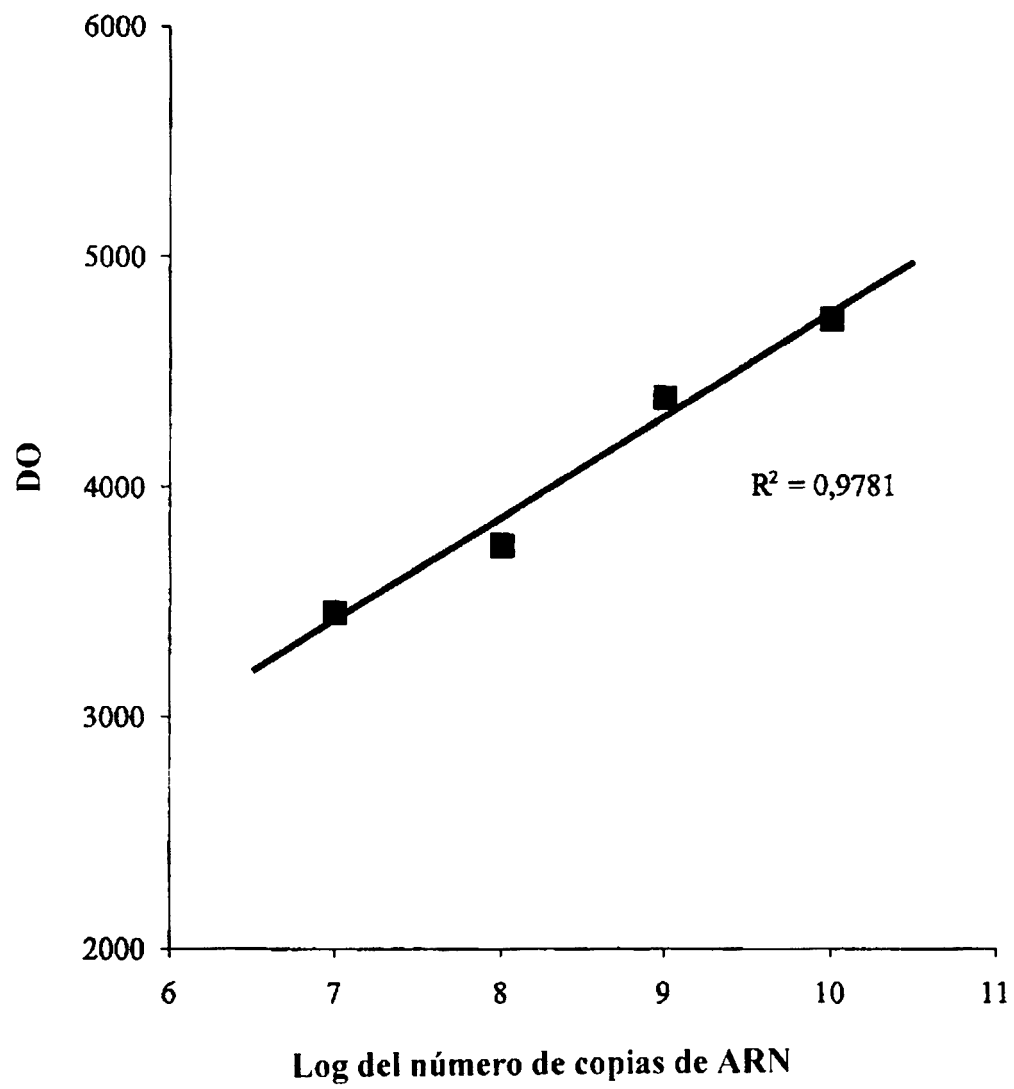


FIGURA 3

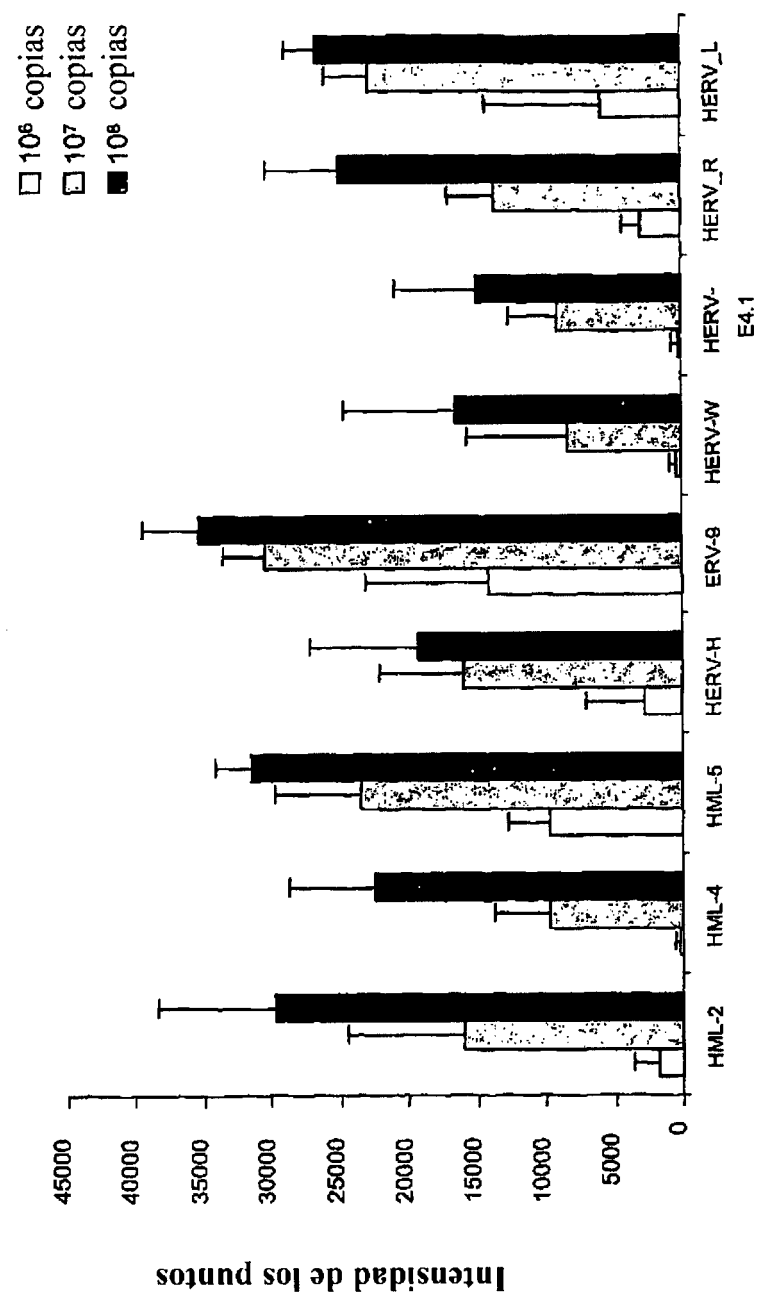


FIGURA 4

ES 2 308 570 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

5 <120> Método para generar transcritos

<130> desconocido

10 <160> 29

<170> PatenIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 737

<212> ARN

<213> HML.4

20

<400> 1

25	gucacuguca agccuccaga ugccaucccu uugacuugaa aacucagcca guuugggugg	60
	aucaguggcc gcucccaaaa aaauagcugg aggcgcucca uauuuuaguc cuggaacagu	120
	uagaauuggg acacauugag gaauuuucu cuccauggaa uucacuuguc uuuguuaucc	180
	aaaagaaauc uggggaaaac agagaauvcu cacucaucuu agggcaguuu augcuguacu	240
30	ucaaccucug gggacauuac aaucuggcuu acccucccgc ucuauvcucg cugaguauug	300
	gccucuaauc cucauagauc uuaaagauug cuuuuuuuaac auuccacugg ccucucagga	360
	cuuugaaaag uuugcuuuua uggucccuuc ccucaacaau gucgcucagg cuacaugcua	420
35	cuauuggaaa guccuaccac aaggcaugcu uauuaguccc acuauuuguc aguauuuugu	480
	ggggcgugug cuucaaccug ucagggauca guuuccccga uguuacaucg uucacuacau	540
	ggaugaucuc cucugcacag ccccccaua caccuuuuug auuuccugcu uuucugugau	600
40	ucaacaggcc auuucagaag cagguuugac uauugcacca gaaaaauuc aaacuaccuc	660
	ucauuuucua uauuugggca ugcaguugga agacaagcug auuacaccac aaaaaguuca	720
45	gcuuaggaga gacgccu	737

<210> 2

<211> 857

50 <212> ARN

<213> HERV.E4.1

<400> 2

55	ggccaagaga uaagaccagc ucuggcuuag cgguggccaa gagugugggc ggaagacaac	60
	ccuccagggg uggcagucua ccaagccccc gugcuuauag aaguuaagcc ugggguccag	120
	ccgguuaggc aaaaacagua cccgguccuc agagaagcuc uugaagguau ccagguccau	180
60	cucaagugcc uaagaaccuu uagaauuua guuccuuguc agucuccaug gaacacuccc	240
	cuccugccug uucccaagcc ugggaccaag gacucagggc cgguacagga uuugcgcuug	300
65	guuaaucagg cuacagugac uuuaucucca acaguaccua accucgacac auugcugggg	360

ES 2 308 570 T3

	uugcugccag cugaggacag cugguucacc ugcuuggacc ugaaagaugc cuucuuuagc	420
	aucagauuag cccugagag acagaagcug uuugccuuuc agugggaaga uccagaguca	480
5	ggugucacua cucaauacac uuggaccacag ccuccccaac gguucaagaa cccccccacc	540
	aucuuugggg aggcguuggc ucgagaccuc cagaaguuuc ccaccagaga ccuaggcugc	600
	guguugcucc aguacguuga ugaccuuuug cugggacacc ccacggcagu cgggugcgcc	660
10	aagggaacag augcucuacu ccggcaccug gaggacugug gguauaaggu guccaagaaa	720
	aaaagcucag aucugccgac agcagguaug uuacuuggga uuacuaucc aacaggggga	780
	gcacagccug ggaucaagaa gaaagcaggu cauuuguaau cuaccggagc cuaagaccag	840
15	aaggcaggug agagaau	857

<210> 3

<211> 62

20 <212> ADN

<213> Artificial

<400> 3

25	taatacgact cactataggg agatctagca gcataggggg ggctgtgcag aggagatcat	60
	cc	62

<210> 4

30 <211> 62

<212> ADN

<213> HERV-E4

35 <400> 4

	taatacgact cactataggg agatctagca gcatacagca aaagggtcatc aacgtactgg	60
40	ag	62

<210> 5

<211> 22

45 <212> ADN

<213> HML.4

<400> 5

50	caacctgtca gggatcagtt tc	22
----	--------------------------	----

<210> 6

<211> 22

55 <212> ADN

<213> HERV.E4.1

<400> 6

60	ctcgagacct ccagaagttt cc	22
----	--------------------------	----

<210> 7

<211> 828

65 <212> ARN

<213> HML-2

ES 2 308 570 T3

<400> 7

	cacuguagag ccuccuaaac ccuacccauu aacuuggaaa acagaaaaac uggugugggu	60
5	aaucagugg ccacuaacaa aacaaaaacu ggaggcuua cauuuuuag caaauagaaca	120
	guuagaaaag ggucuuuuu agccuucauu cucgccuugg aaucuccug uguuuuuaa	180
	ucagaagaaa ucaggcaau ggcauauuu aacugacuua agggucguaa acgccguau	240
10	ucaacccaug gggccucucc aacccggguu gccucuccg gccaugaucc caaagauug	300
	gccuuuaguu auauuugauc uaaaggauug cuuuuuuacc auccucuccg cggagcagga	360
	uugcgaaaaa uuugccuuua cuauaccagc cauaauuuu aaagaaccag ccaccagguu	420
15	ucaguggaaa uuguuaccuc agggaaugcu uauuagucca acuuuuuug agacuuuuu	480
	aggucgagcu cuucaaccag uuagagacaa guuuucagac uguuuuuuu ucauuuuu	540
	ugaugauuu uuauugucua cagaaacgag agauuuuuu auugacuguu aucauuuuu	600
20	gcaagcagag guugccauug caggacuggc aaugcaucu guuaagaucc aaaccucac	660
	uccuuuucau uuuuuaggga ugcagauaga aaauagaaa auuaagccac aaaaauaga	720
	auuaagaaa gacacuuua aaacacuaa ugaauuuca aaauugcug gagauuuua	780
25	uuggauucg ccaacucua gcauuccuac uuaugccaug ucauuuuu	828

<210> 8

<211> 870

<212> ARN

30 <213> HML-5

<400> 8

35	uauccauuu ggguagacca guggccuuu aaggagaga aaugcaaag agcccaugag	60
	uuuguugaag agcauuuaa agccagccau auagaaccu caaaaagacc uuggauuua	120
	cccavuuua ucauuccaa aaagucuggu aaauagagac uuugcauga cuaacugcu	180
40	aucauugcu auuuuagacc uauuggacc cuugagcag uguucuccuc cccuucagug	240
	auuccuugag auuggcauu aauguuuuu ggcuuuuuu acugcauuu uacuuuuuu	300
	uuugcagaac aggacagaga aaaaauugug uuuaauuac cagcuuuua uacgaaag	360
45	ccagcucucc gauuucacug gaaagugcu ccugaaggga ugcuaaacag uccuaccug	420
	ugucaguauc auguaauua agcuuugcuc cucaguaga aagaauuuc uauuugcaag	480
50	acuauucauu uuauuggaau uuuuuuacua gcagcccaa uggauccagc acuuuuuagu	540
	uuauuguccu guuguuuaa gaauacacag uuaagagguu uaucauagc accugaaaa	600
	guacagauu ucucuccuug gaaauuucuu ggguacauac uaaucucug gucaguaga	660
55	ccucaaagg uuauuuuaa uacugcaac uuacacacc uaaugauua ucagaaaua	720
	cuaggcaua uuaacugcu uugccccacc uugggcaua cuacugaua guuacagaac	780
	cuguuuuua ucuuuuuaga caaugcugcu cuagacucuc ccagguuuu aacuccugca	840
60	gcacaaaggg aaauugagga aguagagcac	870

<210> 9

<211> 866

<212> ARN

65 <213> HERV-H

ES 2 308 570 T3

<400> 9

	cacccuuacc	cugcucaaug	ccaauauccc	auccacacagc	augcuuuaaa	aggauuaaag	60
5	ccuguuauc	cugccugcu	acagcauggg	cuucuaagaac	cuauaaacuc	ucuuuuc	120
	uaccccauuu	uaccugucca	aaaaccggau	aagucuuaca	gacuauguca	gaauucugcu	180
	cuuaucaacc	aaaauuuuuu	gccuauccac	ccuguggugc	ccaaccugua	cacucuuuug	240
10	uccucaauac	cuuccuccac	aacucacuau	uccgugcuug	aucuuuaaga	ugguuuuuuc	300
	acuauuucc	ugcacuccuc	guccagccu	cucuuugcuu	ucaccuggac	ugacccugac	360
	acccaucagu	cccagcagcu	uaccuggacu	gugcugccgc	aagguuucag	ggacagcccu	420
15	cguuacuuca	gccaagcucu	uucucaugau	cuacuauccu	uccacccuc	cgcuuucac	480
	cuuauucaa	auauugauga	gcuuuucuu	uguagcccu	ccuuugaau	uucuaauaa	540
	gacacacuu	ugcuccuuc	gcauuuauu	uccaaaggau	aucggguau	ccccuccaaa	600
20	gcuaaaauu	cuucuccauc	cguuaccuac	cucggcauaa	uucuucauaa	gaacacacgu	660
	gcucuccuc	ccgaccgugu	cugacuaauc	ucucaagccc	caaccccuuc	uacaaaacaa	720
	caacuccuu	ccuuccuggg	cguuguugga	uacuuucgcc	uuuggauacc	ugguuuugcc	780
25	auccuaacaa	aaccuuuaa	uaaacucaca	aaaggaaacu	uagcugaccc	cauagaucuu	840
	aaauccuuu	cccacuccuc	uuucug				866

<210> 10

30 <211> 773

<212> ARN

<213> ERV-9

35 <400> 10

	cugaagcucu	uaaaggauua	caggauauug	uuaaacauuu	aaaagcucaa	ggcuuaguua	60
40	ggaaaugcag	cagucccugc	aacaccccaa	uucuaaggagu	acaaaaacca	aauggucacu	120
	ggagacuagu	gcaagaucuu	agacucauca	augaggcagu	aaauccucua	uauccaguug	180
45	uacccaaccc	cuauaccug	cuuucuaaaa	uaccagagga	agcagaauug	uucaugguuc	240
	uggaccucaa	ggaugccuuc	uucuguuucc	ccugcacucu	gacucccagu	uucuguuugc	300
	cuuugaggau	cccacagacc	acacguccca	acuuacaugg	auggucuuuc	cacaaggguu	360
50	uagggauagc	ccuacccugu	uuggucaggc	acuggcccaa	gaucuaaggcc	acuucucaag	420
	uccaggcacu	uugguccuuc	aguaugugga	ugauuuacuu	uuggcuacca	guucagaagc	480
	cucaugccag	caggcuacuc	uagaucucuu	gaacuuucua	ccuaaucaag	gguaacaaggc	540
55	aucuagguca	aaggugcagc	uuugcuuaca	gcaggcuaaa	uaucuaggcc	uaaucuuagc	600
	cagagggacc	agggcccuca	gcaaggaaug	aaucagccu	auacuggcuu	auccuugccc	660
	uaagacauua	aaacaguugc	agggguuccu	uggaauacc	ggcuuuugcc	gacuauggau	720
60	cccuggauac	agugagauag	ucaggcccu	ccauacucua	aucaaggaga	ccc	773

<210> 11

<211> 815

65 <212> ARN

<213> HERV-W

ES 2 308 570 T3

<400> 11

	gacccaaggc ccaacaagga cuccaaaaga uuguuaagga ccuaaaagcc caaggccuag	60
5	uaaaaccaug caguaacccc ugcaguacuc caauuuuagg aguacagaaa cccaacagac	120
	aguggagguu agugcaagau cucaggauua ucaaugaggc uguuguuccu cuauagccag	180
	cuguaccuag cccuuauacu cugcuuucc aaauaccaga ggaagcagag ugguuuacag	240
10	uccuggaccu ucaggaugcc uuuuucugca ucccuguaca uccugacucu caauucuuugu	300
	uugccuuuga agauacuua aacccaacau cucaacucac cuggacuuuu uaccccaagg	360
	uucagggaau guccccaucu auuugccagg cauugccca agacuugagc caauccucau	420
15	accuggacac uugucuucgg uagguggaug auuuacuuuu ggccgcccav ucagaaaccu	480
	ugugccauca agccacccaa gcgcucuua auuuccucgc uaccuguggc uacaugguuu	540
	ccaaaccaa ggcucaacuc ugcucacagc agguuacua gggcuaaaau uauccaaagg	600
20	caccagggcc cucagugagg aacacaucca gccuauacug gcuuauccuc aucccaaaac	660
	ccuaaagcaa cuaaggggau uccuuggcgu aauagguuuc ugccgaaaau ggauucccag	720
	guauggcgaa auagccaggu cauuaaaauac acuaauuaag gaaacucaga aagccaauac	780
25	ccauuuagua agauggacaa cugaaguaga agugg	815

<210> 12

<211> 856

30 <212> ARN

<213> HERV-R

<400> 12

35	aucauaauGC aaugccaguc acccuggaac acuccacuuu ugcugguaca aaaaccauug	60
	ccuggaccag 'gaucugauga guauauacug gugcagggcu ugcaugcugu aaaccaagcc	120
	acggugacca uacauccagu aguaccaaac cuguauacuu uaaugggacu uauucuagca	180
40	agugccaccu gguuuacagu ccuggacuua aaggauvcuu uccucugucu cuaccuggca	240
	ccaguuaguc agcccaucuu ugcauuuuua ugggacaaau cagucacagg cacaggggga	300
	cagcucgccu ggacuagucu cccacaaggg uucaagaauu cucccacaau cuuuggggaa	360
45	gcacuggccu cagaccuca a ggcavacacc ccaccaaau acaacugcgc cuuguuvcag	420
	uacauagaca acccuucuuu uggcagcccc aacccaaga ggacuguaac ugggggaacc	480
	caggaccucc uccaucucu auvggaaagc agguuauaga guauccaaaa agaaggccca	540
50	aaauugccau gaaaaggvua aaauuuuagg cuucauagua agccaagggg aacgcuggc	600
	uggccauvga ugaaagcaag ccuuuuguc acuuccaacu ccaaccaccu ggcgcacaa	660
	aggggaauuc uuaggggcag caggguucug ccuauucug aucccaauu ucucacuau	720
55	agccagggcc uuauaugaag ccacaagggg gggugaaaag gaacccucc ucugaaaggc	780
	ugaccagaag aagguguuuu acaaaucua agaagcucua acucaggcuc cagccuuagg	840
60	acugccagau acua	856

<210> 13

<211> 819

65 <212> ARN

<213> HERV-L

ES 2 308 570 T3

<400> 13		
	uuauuggagu uauggcucag gucugacuaa cagcaggucc aguggguccc uggacucauc	60
5	cuguguucau uuucccagug ccagaauuca uauuuggcau ugucauacuu agaggcuggc	120
	agaacccccca cauugauucu gugacuggua aggugagggc uauuauuggug ggaaaggcca	180
	aauggaagcc auugggagcug ccuuuaccua ggaaaauagu aaaucaaaaa cauuuacacc	240
10	accuggagg gavugcagag auuagugcca ccaucaagga cuugaaaaau gcaggggugg	300
	cgaaucccau aacaucuuug uucaacucuc cuuuuuggcc ugugcagaag acagauggau	360
	cuuggagaau gagaguggau uaucauaagc uuaaccaagu ggugacucca auugcagcug	420
15	cuauacaaga ugugguuuuc auugcucaag caaauuaaua caucuccugg uaccuuguau	480
	gcagccauug acuuggcaaa uggccuuua ccauuuccau aagccccacc agaagcgauu	540
	ugccuucagc uggcaaggcc agcaauguau cuuucuguc cuacuucagg gguauaucaa	600
20	cucuccggcu ugugucuaa aucuuauuca gagugaucuu gaucacuuu cacugccaca	660
	agauaucaca cugguccauu acauugaugg cauuauguug auuggaucca augagcaaga	720
	aquaqcaaac acacuggacu uauuggugag acauuugcau gccauaggau gggaaauaaa	780
25		
	uccaaauaaa auucacgcac ccucuaccuc aguaaaauu	819
<210> 14		
30	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> HML-2	
35	<400> 14	
	aattctaata cgactcacta tagggagaca cataaaatat catcaacata	50
40		
	<210> 15	
	<211> 50	
	<212> ADN	
45	<213> HML4	
	<400> 15	
50	aattctaata cgactcacta tagggagatg cagaggagat catccatgta	50
	<210> 16	
55	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> HML-5	
60	<400> 16	
	aattctaata cgactcacta tagggagact agtaaaatat catccataaa	50
65		
	<210> 17	
	<211> 50	

ES 2 308 570 T3

<212> ADN

<213> HERV-H

5 <400> 17

aattctaata cgactcacta tagggagaaa agtagaaggt catcaatata 50

10

<210> 18

<211> 51

<212> ADN

15 <213> ERV-9

<400> 18

20

aattctaata cgactcacta tagggagaag taaatcatcc acatactgaa g 51

<210> 19

25 <211> 50

<212> ADN

<213> HERV-W

30 <400> 19

aattctaata cgactcacta tagggagaaa gtaaatac cactaccga 50

35

<210> 20

<211> 50

<212> ADN

40 <213> HERV E4.1

<400> 20

45

aattctaata cgactcacta tagggagacc agcaaaaggt catcaacgta 50

<210> 21

50 <211> 50

<212> ADN

<213> HERV-R

55 <400> 21

aattctaata cgactcacta tagggagacc aaaagaaggt tgtctatgta 50

60

<210> 22

<211> 50

<212> ADN

65 <213> HERV-L

ES 2 308 570 T3

	<400> 22		
5	aattctaata cgactcacta tagggagatc arcataatgy catcaatgta	50	
	<210> 23		
	<211> 24		
10	<212> ADN		
	<213> HML-2		
	<400> 23		
15	caaccagtta gagacaagtt ttca	24	
	<210> 24		
20	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> HML-5		
25	<400> 24		
	ttgctcccca gtagaaaaga att	23	
30	<210> 25		
	<211> 25		
35	<212> ADN		
	<213> HERV-H		
	<400> 25		
40	gacagccccc attacttcag tcaag	25	
	<210> 26		
45	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> ERV-9		
50	<400> 26		
	ccaagatcta ggccacttct ca	22	
55	<210> 27		
	<211> 21		
60	<212> ADN		
	<213> HERV-W		
	<400> 27		
65	catctatttg gccaggcatt a	21	

ES 2 308 570 T3

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

5 <213> HERV-R

<400> 28

10 **agacctcaag gcatacaccc** 20

<210> 29

15 <211> 23

<212> ADN

<213> HER-L

20 <400> 29

gctttgtgtc ataatttat tcg 23

25

30

35

40

45

50

55

60

65