



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 525**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04017701 .6**

96 Fecha de presentación : **27.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1502961**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Nuevo formato de detección para las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real de inicio en caliente.**

30 Prioridad: **01.08.2003 EP 03016669**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.01.2011**

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE**  
**F. Hoffmann-La Roche AG.**

72 Inventor/es: **Laue, Frank;**  
**Heindl, Dieter y**  
**Ankenbauer, Waltraud**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 350 525 T3**

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

NUEVO FORMATO DE DETECCIÓN PARA LAS REACCIONES EN CADENA DE  
5 LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL DE INICIO EN CALIENTE

Descripción

**Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la PCR en  
tiempo real. Más particularmente, la presente invención  
10 proporciona un nuevo método para la PCR en tiempo real, se  
realiza el seguimiento de la amplificación caracterizada de  
un ADN diana mediante hibridación con una sonda de  
hibridación fluorescente apropiadamente marcada en  
combinación con una química específica que proporciona un  
15 efecto de PCR de inicio en caliente.

**Antecedentes de la técnica anterior**

La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena  
de la polimerasa (PCR) es una técnica fundamental de la  
biología molecular. El análisis de los ácidos nucleicos  
20 mediante PCR requiere la preparación de la muestra, la  
amplificación y el análisis del producto. Aunque estas  
etapas habitualmente se llevan a cabo secuencialmente, la  
amplificación y el análisis pueden producirse  
simultáneamente. Pueden añadirse pigmentos de ADN o sondas  
25 fluorescentes a la mezcla de PCR antes de la amplificación y  
utilizarse para analizar los productos de PCR durante la  
misma. El análisis de la muestra se realiza concurrentemente  
a la amplificación en el mismo tubo dentro del mismo  
instrumento. Este enfoque combinado reduce la manipulación  
30 de la muestra, ahorra tiempo y reduce en gran medida el  
riesgo de contaminación del producto para reacciones

posteriores, debido a que no existe necesidad de extraer las muestras de los recipientes cerrados para el análisis posterior. El concepto de combinar la amplificación con el análisis de producto se ha venido a denominar PCR "en tiempo real" (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.174.670).

#### **Formatos de detección de PCR en tiempo real**

En la PCR en tiempo real cinética, se realiza el seguimiento de los productos de PCR en cada ciclo de la misma. La amplificación habitualmente se mide en termocicladores que presentan dispositivos adicionales para medir las señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación.

##### a) Formato de pigmento ligante de ADN

Debido a que la cantidad de producto de amplificación de doble cadena habitualmente excede la cantidad de ácido nucleico originalmente presente en la muestra que debe analizarse, pueden utilizarse pigmentos específicos de ADN de doble cadena, que tras la excitación con una longitud de onda apropiada muestran una fluorescencia incrementada únicamente en el caso de que se encuentren unidos a ADN de doble cadena. Preferentemente pueden utilizarse únicamente aquellos pigmentos que, tal como SybrGreenI, por ejemplo, no afecten a la eficiencia de la reacción de PCR.

Todos los demás formatos conocidos de la técnica requieren el diseño de una sonda de hibridación marcada fluorescente que únicamente emita fluorescencia tras la unión a su ácido nucleico diana.

##### b) Balizas moleculares

Dichas sondas de hibridación también se marcan con un primer componente y con un extintor, encontrándose los marcajes situados preferentemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran en vecindad espacial en solución. Tras la hibridación a los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan uno de otro de manera que, tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, puede medirse la emisión de fluorescencia del primer componente (patente US nº 5.118.801).

c) Sondas de hibridación FRET

La forma de ensayo de sonda de hibridación FRET resulta especialmente útil para todos los tipos de ensayo de hibridación homogénea (Matthews J.A. y Kricka L.J., Analytical Biochemistry 169:1-25, 169). Se caracteriza por dos sondas de hibridación de una cadena que se utilizan simultáneamente y que son complementarios a sitios contiguos de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas se marcan con diferentes componentes fluorescentes. Al excitarse con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente según el principio de transferencia energética por resonancia de fluorescencia, de manera que puede medirse una emisión de fluorescencia del segundo componente al unirse ambas sondas de hibridación a posiciones contiguas de la molécula diana que debe detectarse. Alternativamente al seguimiento del incremento de la fluorescencia del componente aceptor de FRET, también resulta posible realizar el seguimiento de la reducción de

la fluorescencia del componente donante FRET a modo de medición cuantitativa de los sucesos de hibridación.

En particular, el formato de sonda de hibridación FRET puede utilizarse en la PCR en tiempo real con el fin de  
5 detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos de la técnica de PCR en tiempo real, se ha demostrado que el formato de sonda de hibridación FRET es altamente sensible, preciso y fiable (patentes WO n° 97/46707, n° 97/46712 y n° 97/46714). A modo de alternativa  
10 a la utilización de un cebador marcado fluorescentemente, también resulta posible utilizar un cebador marcado fluorescentemente y únicamente una sola sonda oligonucleótida marcada (Bernard P.S. *et al.*, *Analytical Biochemistry* 255:101-107, 1998). A este respecto, puede  
15 seleccionarse arbitrariamente si el cebador se marca con el donador de FRET o con el compuesto aceptor de FRET.

d) Formato de sonda de marcaje único (SLP)

Este formato de detección consiste de un único oligonucleótido marcado con un único pigmento fluorescente  
20 en el extremo 5' ó 3' (patente WO n° 02/14555). Pueden utilizarse dos diseños diferentes para el marcaje de oligos: sondas G-Quenching y sondas nitroindol-desatenuantes. En la realización de G-Quenching, el pigmento fluorescente se une a un C en el extremo 5' ó 3' del oligo. La fluorescencia se  
25 reduce significativamente al hibridarse la sonda con la diana, en el caso de que se encuentren dos G en la cadena diana delante de Cs y en la posición 1 aparte de la sonda oligonucleótida complementaria. En la realización de nitronindol-desatenuantes, el pigmento fluorescente se une a

nitroindol en el extremo 5' ó 3' del oligonucleótido. El nitroindol en cierta manera reduce la señalización fluorescente de la sonda libre. Se incrementa la fluorescencia al hibridarse la sonda al ADN diana debido a un efecto de desatenuación.

e) Sonda TaqMan

Se marca con dos componentes una sonda de hibridación de una cadena. Al excitar el primer componente con luz de una longitud de onda adecuada, se transfiere la energía absorbida al segundo componente, el denominado extintor, según el principio de transferencia energética por resonancia de fluorescencia. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y es degradado por la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa Taq durante la etapa de alargamiento posterior. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el extintor se encuentra separados espacialmente uno de otro y, de esta manera, puede medirse una emisión de fluorescencia del primer componente. Los ensayos de sonda TaqMan se dan a conocer en detalle en las patentes US n° 5.210.015, n° 5.538.848 y n° 5.487.972. Las sondas de hibridación TaqMan y mezclas de reactivos se dan a conocer en la patente US n° 5.804.375.

f) Formatos de liberación

Además, recientemente se han dado a conocer dos otros formatos restringidos a la detección específica de alelo que se basan en el principio de detección específica de una liberación de un nucleótido 3'-terminal marcado debido a una situación de correspondencia o no correspondencia con

respecto a su unión al ácido nucleico diana. La patente US nº 6.391.551 da a conocer un método caracterizado porque el nucleótido 3'-terminal de una sonda de hibridación resulta liberado por un enzima despolimerizador en el caso de que se  
5 haya producido una correspondencia perfecta entre la secuencia diana y la sonda. De manera similar, la patente EP nº 0 930 370 sugiere la utilización de un cebador marcado con un informador y con un grupo extintor, caracterizado porque una actividad de corrección de errores 3'-5' elimina  
10 un grupo en el caso de que se haya producido una correspondencia no perfecta entre el cebador y la diana de amplificación.

#### Enzimología de la PCR

La síntesis de ácidos nucleicos *in vitro* se lleva a  
15 cabo rutinariamente con ADN polimerasas con o sin polipéptidos adicionales. Las ADN polimerasas son una familia de enzimas implicada en la replicación y reparación del ADN. Se ha llevado a cabo investigación extensiva sobre el aislamiento de las ADN polimerasas a partir de  
20 microorganismos mesofílicos, tales como *E. coli* (ver, por ejemplo, Bessman, ..., *et al.*, J. Biol. Chem. 223:171-177, 1957; y Buttin G., Kornberg A., J. Biol. Chem. 241:5419-5427, 1966).

También se ha llevado a cabo investigación sobre el  
25 aislamiento y la purificación de ADN polimerasas procedentes de termófilos, tales como *Thermus aquaticus*. Chien A. *et al.*, J. Bacteriol. 127:1550-1557, 1976, dan a conocer el aislamiento y purificación de una ADN polimerasa con un óptimo de temperatura de 80°C procedente de la cepa YT1 de

Thermus aquaticus. La patente US nº 4.889.818 da a conocer una ADN polimerasa termoestable purificada de *T. aquaticus*, la polimerasa Taq, que presenta un peso molecular de aproximadamente 86.000 a 90.000 daltons. Además, la  
5 solicitud de patente europea nº 0 258 017 da a conocer una polimerasa Taq como el enzima preferente para la utilización en el procedimiento de PCR.

La investigación indica que, aunque la ADN polimerasa Taq, presenta una función exonucleasa 5'-3' polimerasa-  
10 dependiente, la ADN polimerasa Taq no presenta una función exonucleasa 3'-5' (Lawyer F.C. *et al.*, J. Biol. Chem. 264:6427-6437, 1989; Bernad A. *et al.*, Cell 59:219-228, 1989). La actividad exonucleasa 3'-5' de las ADN polimerasas comúnmente se denomina "actividad de corrección de errores".  
15 La actividad exonucleasa 3'-5' elimina bases desapareadas en el extremo 3' de un dúplex de cebador-molde. La presencia de actividad exonucleasa 3'-5' puede resultar ventajosa en el caso de que conduzca a un incremento de la fidelidad de la replicación de las cadenas de ácidos nucleicos y al  
20 alargamiento de productos terminados prematuramente. Debido a que la ADN polimerasa Taq no es capaz de eliminar los extremos de cebador no apareados, presenta una tendencia a errores de incorporación de bases, provocando que su utilización en determinadas aplicaciones no resulte  
25 deseable. Por ejemplo, intentar clonar un gen amplificado resulta problemático debido a que una copia del gen puede contener un error debido a un suceso de incorporación incorrecta aleatoria. Dependiendo del ciclo en el que se produce dicho error (por ejemplo, en uno de los primeros

ciclos de replicación), el ADN amplificado entero podría contener la base erróneamente incorporada, dando lugar de esta manera a un producto génico mutado.

Existen varias ADN polimerasas termoestables conocidas de la técnica que muestran actividad exonucleasa 3'-5', tales como polimerasas de tipo B procedentes de arqueobacterias termofílicas que se utilizan para la amplificación de ADN de alta afinidad. Las polimerasas termoestables que muestran actividad de exonucleasa 3'-5' pueden aislarse o clonarse de *Pyrococcus* (ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* termoestable purificada; Mathur E., Strategene, patente WO n° 92/09689, patente US n° 5.545.552; Purified thermoestable DNA polymerase from *Pyrococcus* species, Comb D.G. et al., New England Biolabs, Inc., patente EP n° 0 547 359; Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*; Uemori T. et al., Nucleic Acids Res. 21:259-265, 1993, de especies de *Pyrodictium* (Thermostable nucleic acid polymerase, Gelfand D.H., F. Hoffmann-La Roche AG, patente EP n° 0 624 641; Purified thermostable nucleic acid polymerase and DNA coding sequences from *Pyrodictium* species, Gelfand D.H., Hoffmann-La Roche Inc., patente US n° 5.491.086), de *Thermococcus* (por ejemplo ADN polimerasa termoestable de *Thermococcus* spec. TY; Niehaus F. et al., patente WO n° 97/35988; Purified *Thermococcus barossii* DNA polymerase, Luhm R.A., Pharmacia Biotech., Inc., patente WO n° 96/22389; DNA polymerase from *Thermococcus barossii* with intermediate exonuclease activity and better long term stability at high temperature, useful for DNA sequencing,

PCR etc., Dhennezel O.B., Pharmacia Biotech Inc., patente WO n° 96/22389; A purified thermostable DNA polymerase from *Thermococcus litoralis* for use in DNA manipulations, Comb D.G., New England Biolabs, Inc., patente US n° 5.322.7865, EP n° 0 455 430; Recombinant thermostable DNA polymerase from *Archaeobacteria*, Comb D.G., New England Biolabs, Inc., patente US n° 5.352.778, EP n° 0 547 920 y EP n° 0 701 000; New isolated thermostable DNA polymerase obtained from *Thermococcus gorgonarius*, Angerer B. et al., Boehringer Mannheim GmbH, patente WO n° 98/14590.

Una posibilidad de preparación de una reacción de PCR de elevada procesividad y actividad adicional de corrección de errores son las mezclas de polimerasas Taq y exonucleasas dependientes del molde bastante termoestables. En este contexto, el documento EP n° A-1088891 da a conocer un enzima termoestable obtenible de *Archaeoglobus fulgidus*, que cataliza la degradación de extremos no apareados de cebadores o polinucleótidos en la dirección 3' a 5' en ADN de doble cadena. Se clonó el gen codificante de la exonucleasa III termoestable obtenible de *Archaeoglobus fulgidus* (Afu) y se expresó en *E. coli* y se aisló. El enzima se encuentra activo bajo las condiciones de incubación y de temperatura utilizadas en las reacciones de PCR. El enzima proporciona soporte a ADN polimerasas tales como Taq en la realización de la síntesis de ADN a tasas de error bajas y síntesis de productos no superiores a 3 kb en ADN genómico (el rango superior de los productos sintetizados por la polimerasa Taq) con buenos rendimientos con o sin dUTP presentes en la mezcla de reacción. Preferentemente se

utilizaron 50 a 500 ng de la exonucleasa III obtenible de Afu por cada 2,5 U de polimerasa Taq con el fin de obtener un rendimiento óptimo de la PCR. Más preferentemente es la utilización de 67 a 380 ng de la exonucleasa III obtenible de Afu por cada 2,5 U de la polimerasas Taq en la reacción de PCR.

#### PCR de inicio en caliente

Otro problema importante de la amplificación de ácidos nucleicos y más especialmente con la PCR es la generación de productos de amplificación no específicos. En muchos casos, lo anterior se debe a un cebador oligonucleótido no específico y el suceso de extensión de cebador posterior antes del procedimiento de termociclado real mismo, debido a que las ADN polimerasas termoestables también se encuentran moderadamente activas a temperatura ambiente. Por ejemplo, se observan con frecuencia productos de amplificación debidos a la dimerización aleatoria de cebadores y posterior extensión. Con el fin de superar este problema, es bien conocido de la técnica la realización de una denominada PCR "de inicio en caliente", en la que un componente esencial para la reacción de amplificación se separa de la mezcla de reacción o se mantiene en un estado inactivo hasta que la temperatura de la mezcla de reacción se ha elevado por primera vez. Debido a que la polimerasa no puede funcionar bajo estas condiciones, no se produce alargamiento de cebador durante el periodo cuando los cebadores pueden unirse no específicamente. Con el fin de conseguir este efecto, se han aplicado varios métodos:

a) separación física de la ADN polimerasa.

La separación física puede conseguirse, por ejemplo, mediante una barrera de cera sólida, que separa el compartimiento que contiene la ADN polimerasa del compartimiento que contiene la mayor parte de los demás reactivos. Durante la primera etapa de calentamiento, la cera se funde automáticamente y los compartimientos de fluido se mezclan (Chou Q. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20:1717-1723, 1992). Alternativamente, la ADN polimerasa se inmoviliza por afinidad sobre un soporte sólido previamente a la reacción de amplificación y únicamente se libera en la mezcla de reacción mediante una liberación mediada por calor (Nilsson J. *et al.*, *Biotechniques* 22:744-751, 1997). Sin embargo, ambos métodos exigen mucho tiempo y resulta de realización poco conveniente.

15 b) Modificación química de ADN polimerasa.

Para este tipo de PCR de inicio en caliente, la ADN polimerasa se inactiva reversiblemente como resultado de una modificación química. Más exactamente, se introducen grupos bloqueadores lábiles al calor en la ADN polimerasa Taq que inactivan el enzima a temperatura ambiente. Estos grupos bloqueantes se eliminan a temperatura elevada durante una etapa previa a la PCR, de manera que se activa el enzima. Este tipo de modificación lábil al calor, por ejemplo, puede conseguir mediante acoplamiento de anhídrido citracónico o anhídrido aconítrico a los residuos de lisina del enzima (patente US nº 5.677.152). Los enzimas que portan dichas modificaciones se encuentran disponibles comercialmente, tales como ADN polimerasa Amplitaq Gold (Moretti T. *et al.*, *Biotechniques* 25:716-722, 1998) o ADN polimerasa FastStart

(Roche Molecular Biochemicals). Sin embargo, la introducción de grupos bloqueantes es una reacción química que se produce arbitrariamente en todos los residuos de lisina estéricamente disponibles del enzima. Por lo tanto, la reproducibilidad y calidad de las preparaciones de enzima modificadas químicamente puede variar y resulta difícil de controlar.

c) Inhibición de la ADN polimerasa con aditivos de ácidos nucleicos

10 Se ha demostrado que la extensión de cebadores hibridados no específicamente resulta inhibida por la adición de fragmentos de ADN de doble cadena cortos (Kainz P. *et al.*, *Biotechniques* 28:278-282, 2000). En este caso, la extensión de los cebadores resulta inhibida a temperaturas inferiores al punto de fusión del fragmento de ADN de doble cadena corto, aunque independiente de la secuencia del ADN competidor mismo. Sin embargo, no es conocido en que grado el exceso de ADN competidor influye sobre el rendimiento de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

20 Alternativamente, pueden utilizarse oligonucleótidos aptámeros con una secuencia específica que resulta en una estructura secundaria definida. Dichos aptámeros han sido seleccionados utilizando la tecnología SELEX para una afinidad muy elevada con la ADN polimerasa (patente US n°

25 5.693.502) (Lin Y. y Jayasena S.D., *J. Mol. Biol.* 271:100-111, 1997). La presencia de dichos aptámeros dentro de la mezcla de amplificación antes del procedimiento de termociclado mismo nuevamente resulta en una unión de alta afinidad a la ADN polimerasa y en consecuencia una

inhibición lábil al calor de su actividad. Sin embargo, debido al procedimiento de selección, todos los aptámeros disponibles hasta el momento únicamente pueden utilizarse en combinación con una especie particular de ADN polimerasa.

5 d) Anticuerpos de ADN Taq

Un enfoque alternativo para conseguir la inhibición de la ADN polimerasa Taq es la adición de anticuerpos monoclonales cultivados contra el enzima purificado (Kellogg D.E. *et al.*, *Biotechniques* 16:1134-1137, 1994; Sharkey D.J. *et al.*, *Biotechnology* (NY) 12:506-509, 1994). Al igual que los oligonucleótidos aptámeros, el anticuerpo se une a la ADN polimerasa Taq con elevada afinidad a temperatura ambiente de un modo inhibitorio. El complejo se resuelve en una etapa de precalentamiento previa al procedimiento de termociclado mismo. Esto conduce a una prolongación sustancial de la amplificación globalmente que requiere mucho tiempo, especialmente en el caso de que se apliquen protocolos de termociclado rápido (patente WO n° 97/46706). La patente US n° 5.985.619 da a conocer una realización específica para llevar a cabo una PCR utilizando un anticuerpo de inicio en caliente, en la que se añade como suplemento a la mezcla de amplificación, aparte de polimerasa Taq, por ejemplo exonucleasa III de *E. coli*, con el fin de digerir intermediarios dímeros cebadores no específicos. Tal como se ha dado a conocer anteriormente, la exonucleasa III reconoce ADN de doble cadena como sustrato, tal como, por ejemplo, híbridos de producto de diana/cebador o de diana/producto de extensión de cebador. La digestión tiene lugar por medio del corte del enlace fosfodiéster en

el extremo 5' del residuo desoxinucleótido 3'-terminal. Debido a que este tipo de exonucleasa se encuentra activo a temperatura ambiente, resultan digeridos todos los cebadores hibridados no específicamente y los productos de extensión de cebador. Sin embargo, la digestión de los cebadores no  
5 específicos dependiente de la duración del tiempo de preincubación puede conducir a una reducción sustancial y no controlada de la concentración de cebador, que a su vez puede afectar a la reacción de amplificación misma.

10 e) Uso de exonucleasas

Otra alternativa para incrementar la eficiencia de amplificación es la utilización de cebadores oligonucleótidos fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de reacción de PCR (patente  
15 EP n° 0 744 470). En este caso, una exonucleasa 3', que habitualmente acepta sustratos de ADN de doble cadena, así como de una cadena, degrada los artefactos dúplex, tales como dímeros cebadores, así como amplicones contaminantes arrastrados, dejando los cebadores de amplificación de una  
20 cadena sin degradar. En este contexto, también se ha sugerido utilizar grupos fosfato unidos al extremo 3' que se eliminan tras la formación de doble cadena como medio para impedir el alargamiento de cebador no dependiente de molde (patente EP n° 0 439 182). De manera similar, se ha sugerido  
25 la utilización de cebadores con extremo 3' modificados abásicos y la eliminación dependiente de molde por parte de la endonucleasa IV de *E. coli* (patente US n° 5.792.607). Sin embargo, existen varias desventajas importantes de estos métodos:

en primer lugar, no pueden sintetizarse oligonucleótidos que contienen residuos fosforotioato de un modo estereoisoméricamente puro. Además, sus temperaturas de hibridación son diferentes en comparación con los oligonucleótidos no modificados de la misma secuencia y se observan frecuentemente sucesos de hibridación no específica. En segundo lugar, los cebadores que contienen residuos fosforotioato incluso a sus extremos 3' todavía pueden alargarse mediante la ADN polimerasa, que ya se encuentra presente en la mezcla de reacción. En otras palabras, el efecto de la exonucleasa se encuentra compensado por lo menos parcialmente por la presencia de la polimerasa misma. En tercer lugar, la actividad enzimática de la endonucleasa IV de *E. coli* es muy baja en presencia de iones  $Mg^{++}$  (Siwek B. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16:5031-5038, 1988). Sin embargo, dependiendo del tipo específico de ensayo, un prerrequisito esencial para una reacción de amplificación por PCR con éxito es una concentración de  $Mg^{++}$  significativa exacta, que convierte a la aplicación de una endonucleasa IV en una muestra de PCR en bastante inefectiva. En cuarto lugar, y más importante, las nucleasas convencionales, tales como la exonucleasa III de *E. coli* o la endonucleasa IV de *E. coli* son termolábiles y por lo tanto únicamente son activas previamente al procedimiento de termociclado mismo. En consecuencia, la unión no específica a cebadores y la extensión únicamente resultan inhibidas antes del procedimiento de termociclado y no durante el mismo.

Una mejora adicional del concepto de exonucleasa para las aplicaciones de inicio en caliente se da a conocer en el documento EP n° A-1 277 841, que permite una inhibición del cebado no específico y de la extensión de cebadores no sólo  
5 antes del procedimiento de amplificación mismo sino también durante el procedimiento de termociclado. A este respecto, el documento EP n° A-277 841 da a conocer una composición para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que comprende una ADN polimerasa termoestable, una  
10 exonucleasa 3'-5' termoestable y por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3'-terminal modificado que no resulta alargado por dicha ADN polimerasa termoestable. En este contexto, la exonucleasa 3'-5' termoestable es más activa a temperaturas de entre  
15 37°C y 72°C, y menos activa a temperaturas inferiores a 37°C. La exonucleasa termoestable puede ser un homólogo de exonucleasa III o una ADN polimerasa mutada con una actividad polimerasa reducida o nula.

El concepto dado a conocer en el documento EP n° A-1  
20 277 841 se basa principalmente en la posibilidad de evitar el alargamiento de los cebadores a temperaturas bajas mediante la introducción de modificaciones químicas en el extremo 3' de por lo menos un cebador. Con el fin de que el cebador resulte accesible a temperaturas de alargamiento de  
25 PCR típicas, el concepto incluye la utilización de una exonucleasa termoestable que es inactiva a temperatura ambiente o inferior, dejando de esta manera sin afectar al cebador modificado a estas temperaturas.

Al incrementarse la temperatura, la exonucleasa se activa y es capaz de eliminar la modificación 3' del cebador, permitiendo de esta manera que el cebador participe en la reacción de amplificación misma. De acuerdo con el concepto, la actividad de exonucleasa es una actividad 3'-5' exonucleasa que reconoce especialmente dichos híbridos de molde-cebador como sustratos. Éste es el caso de la exonucleasa III de *E. coli* y homólogos de otros organismos, que reconoce el ADN de doble cadena con un extremo 5' protuberante como sustrato preferente y resultan especialmente capaces de digerir el extremo 3' hundido del sustrato en dirección 3'-5'.

En vista de la técnica anterior comentada anteriormente, es un objetivo de la invención proporcionar un método económico alternativo para la PCR en tiempo real que facilite un protocolo de inicio en caliente y que simultáneamente permite la detección en tiempo real. En otras palabras, es un objetivo de la presente invención desarrollar un método mejorado de PCR en tiempo real que no requiera aditivos de inicio en caliente adicionales.

#### **Breve descripción de la invención**

El principio subyacente a la presente invención se ilustra esquemáticamente en la fig. 1.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para amplificar y detectar un ácido nucleico diana, que comprende:

- someter dicho ácido nucleico diana a una reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real en presencia de:

- una ADN polimerasa termoestable,

- una exonucleasa 3'-5' termoestable dependiente de doble cadena que no es una ADN polimerasa que presente actividad correctora de errores 3'-5',
  - una pareja de cebadores de amplificación, tales como:
    - desoxinucleósidos trifosfato,
    - una sonda de hibridación que porta un primer marcaje y un segundo marcaje,
    - siendo capaz dicho primer marcaje de actuar como entidad informadora fluorescente al excitarla con luz de una longitud de onda apropiada,
    - siendo capaz dicho segundo marcaje de actuar como entidad extintora de la fluorescencia de dicha entidad informada fluorescente, caracterizado porque un marcaje se encuentra unido al extremo 3' de dicha sonda de hibridación, y **caracterizado** además porque el otro marcaje se encuentra unido internamente o en el extremo 5' a dicha sonda de hibridación,
  - caracterizado adicionalmente porque dicha sonda no participa en el procedimiento de amplificación por medio del cebado de una reacción de polimerización de ADN,
    - realizar un seguimiento de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente por lo menos después de una pluralidad de ciclos de amplificación,
- en el que se crea una señal fluorescente por medio de la eliminación de una entidad fluorescente 3' de dicha sonda de hibridación que realiza dicha exonucleasa termoestable durante cada ciclo de amplificación.

En una realización, la entidad informadora se encuentra en el extremo 3' de dicho oligonucleótido de detección. En una realización principal alternativa, la entidad extintora se encuentra en el extremo 3' de dicho oligonucleótido de  
5 detección.

Preferentemente, el marcaje unido al residuo nucleótido 3'-terminal de dicho oligonucleótido de detección se encuentra unido a dicho oligonucleótido mediante un grupo fosfato.

10 También preferentemente, el segundo marcaje se une a una base de un residuo de dicha sonda de hibridación. Alternativamente, el segundo marcaje puede unirse a un elemento abásico de dicha sonda de hibridación.

La exonucleasa 3'-5' dependiente de doble cadena se  
15 selecciona preferentemente de entre un grupo de enzimas, consistiendo dicho grupo de exonucleasa III, endonucleasa IV, ADN polimerasas que muestran actividad exonucleasa 3'-5' u otros enzimas con actividad exonucleasa 3'-5' o correctora de errores procedentes de eucariotas, procariotas,  
20 arqueobacterias, bacteriófagos o virus.

#### **Descripción detallada de la invención**

Tal como ya se ha descrito de manera general anteriormente, la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo PCR en tiempo real. Se refiere a un  
25 método para la detección y análisis homogéneo de secuencias de ácidos nucleicos por medio de la utilización de oligonucleótidos marcados la fluorescencia de los cuales cambia en respuesta a la hibridación de sonda y diana. La presente invención también se refiere a la degradación de

los extremos 3' de oligonucleótidos hibridados a un molde de ADN, y a un método para cuantificar secuencias específicas en la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real. Predominantemente, la invención se caracteriza porque una sonda de hibridación porta una entidad extintora de la fluorescencia y una entidad informadora fluorescente. De manera similar al formato de detección TaqMan, se crea una señal fluorescente por medio de la eliminación de una entidad fluorescente 3' de dicha sonda de hibridación durante cada ciclo de amplificación.

Más exactamente, la presente invención se refiere a un método para amplificar y detectar un ácido nucleico diana, que comprende:

- someter dicho ácido nucleico diana a una reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real en presencia de:
  - una ADN polimerasa termoestable,
  - una exonucleasa 3'-5' termoestable dependiente de doble cadena que no es una ADN polimerasa que presente actividad correctora de errores 3'-5',
  - una pareja de cebadores de amplificación,
  - desoxinucleósidos trifosfato,
  - una sonda de hibridación que porta un primer marcaje y un segundo marcaje,
  - siendo capaz dicho primer marcaje de actuar como entidad informadora fluorescente al excitarse con luz de una longitud de onda apropiada,
  - siendo capaz dicho segundo marcaje de actuar como entidad extintora de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente,

caracterizado porque un marcaje se encuentra unido al extremo 3' de dicha sonda de hibridación, y **caracterizado** adicionalmente porque el otro marcaje se encuentra unido internamente o en el extremo 5' a dicha sonda de hibridación, caracterizado además porque dicha sonda no participa en el procedimiento de amplificación por medio del cebado de una reacción de polimerización del ADN,

5

10 - realizar el seguimiento de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente después de por lo menos una pluralidad de ciclos de amplificación,

en el que se crea una señal fluorescente por medio de la eliminación de una entidad fluorescente 3' de dicha sonda de hibridación que realiza dicha exonucleasa termoestable durante cada ciclo de amplificación.

15

20 Antes del termociclado mismo, únicamente se produce señalización fluorescente basal o sustancialmente nula debido a la extinción de la entidad informadora fluorescente por parte de la entidad extintora de fluorescencia. Tras el incremento de la temperatura, se activa la exonucleasa termoestable y se inicia la eliminación del marcaje 3'-terminal, con la condición de que la sonda de hibridación se encuentre unida a una molécula diana. Como consecuencia,

25

varía la señalización fluorescente durante cada ciclo de amplificación debido a un incremento de la concentración del ADN diana amplificado.

La polimerasa termoestable puede ser cualquier tipo de ADN polimerasa dependiente de ADN o de ARN, preferentemente la polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*. En una realización específica, se utiliza una mezcla de polimerasas termoestables, en la que una polimerasa Taq proporciona una procesividad elevada y un segundo enzima proporciona una actividad correctora de errores 3'-5' (por ejemplo ROCHE n° de cat. 1732641).

En el contexto de la presente invención, el término "termoestable" se define como un enzima que conserva más de 50%, preferentemente más de 80%, y más preferentemente más de 90% de su actividad tras 60 minutos de incubación a 70°C.

En el contexto de la presente invención, la expresión "exonucleasa 3'-5' termoestable dependiente de doble cadena" se define como una nucleasa que reconoce el extremo recesivo 3'-terminal de un ADN de doble cadena como sustrato y es capaz de cortar directamente cadena arriba (5') del grupo fosfato terminal en el extremo recesivo 3'. También se indica que, en el contexto de la presente invención, dichas exonucleasas se discriminan claramente de las ADN polimerasas que presentan una actividad correctora de errores 3'-5' adicional.

El método según la invención también resulta aplicable a cualquier oligonucleótido marcado en su extremo 3' independiente del enlace entre el compuesto fluorescente y el oligonucleótido mismo. Sin embargo, resulta altamente preferente que el marcaje unido al residuo nucleótido 3'-terminal de dicha sonda de hibridación se una a dicho oligonucleótido mediante un grupo fosfato, debido a que

dicho enlace facilita el corte por parte de la exonucleasa respectiva. En el caso de que se utilicen otros línkers sin un grupo fosfato, el corte más probablemente se produce en el enlace fosfato entre el residuo nucleótido terminal y proxiterminal.

Preferentemente, la exonucleasa 3'-5' termoestable es más activa a temperaturas de entre 37°C y 72°C y menos activa a temperaturas inferiores a 37°C. En otras palabras, la actividad enzimática del enzima a cualquier temperatura inferior a 37°C es, en cualquier caso, inferior en comparación con la actividad enzimática a cualquier temperatura comprendida entre 37°C y 72°C. El óptimo de temperatura para el enzima en consecuencia puede encontrarse comprendido entre 50°C y 85°C.

La exonucleasa termoestable es preferentemente un homólogo de la exonucleasa III que puede originarse a partir cualquier organismo termoestable. En el contexto de la presente invención, se define un homólogo de la exonucleasa III como un enzima que reconoce el ADN de doble cadena con un extremo 5'-protuberante como sustrato y es capaz de eliminar los residuos nucleótidos del extremo 3' retrasado. Un homólogo de la exonucleasa III termoestable de *Archaeoglobus fulgidus* (ExoIII Afu) ha sido dado a conocer recientemente (documento EP nº A-1088891), que resulta especialmente adecuado para los protocolos de inicio en caliente según la invención. La ventaja de utilizar el enzima en comparación con otros enzimas es que:

- el enzima claramente es preferentemente activo en ADN de doble cadena, y

- es altamente activo a temperaturas de entre 37°C y 72°C, pero presenta una actividad baja a temperaturas de entre 20°C y 37°C.

Alternativamente, la exonucleasa 3'-5' termoestable  
5 puede ser una ADN polimerasa mutada con una actividad de polimerasa nula o sustancialmente reducida aunque con una actividad de exonucleasa 3' suficientemente alta. Una actividad de ADN polimerasa reducida en este contexto se refiere a menos de 50% de dicha actividad de un enzima que  
10 muestra actividad de ADN polimerasa. También alternativamente, puede utilizarse la endonucleasa IV para un método según la invención.

Una sonda de hibridación para el seguimiento mismo de la PCR en tiempo real no participa en el procedimiento de  
15 amplificación por medio del cebado de una reacción de polimerización de ADN.

Resulta posible prácticamente cualquier tipo de marcaje y, todavía más importante, se alcanza un grado más alto de especificidad. La desventaja es que, para un ensayo  
20 respectivo, resultan necesarios por lo menos 2 cebadores de amplificación y una sonda de hibridación doblemente marcada adicional. De esta manera, se incrementa la complejidad de dicho ensayo.

Con el fin de obtener un efecto de inicio en caliente  
25 apropiado, puede modificarse por lo menos uno o ambos cebadores de amplificación con un grupo fosfato 3'-terminal u otra modificación que, con el incremento de temperatura, resulta cortado por la exonucleasa termoestable.

Además, para dicha realización se ha demostrado que resulta ventajoso que se impida que la ADN polimerasa termoestable realice una extensión no deseada de la sonda de hibridación durante la PCR. Lo anterior puede obtenerse de  
5 dos maneras diferentes:

i) en el caso de que el marcaje 3'-terminal se una a la sonda de hibridación mediante un grupo fosfato, el nucleótido 3'-terminal puede ser un denominado "finalizador de polimerasa", es decir, un derivado nucleótido o cualquier  
10 otra estructura que sustituya a un residuo nucleótido, que no puede ser alargado por una reacción de ADN polimerasa. Una lista de finalizadores de polimerasa putativos incluye análogos de bases, enlaces internucleosídicos modificados y análogos de sacáridos. Dicha modificación todavía permite el  
15 corte del marcaje 3', pero tras el corte, la polimerasa no puede reconocer el extremo 3' "modificado" que se ha generado,

ii) en el caso de que el marcaje 3'-terminal se encuentre unido a la sonda de hibridación mediante un líker  
20 que no contenga un grupo fosfato, el residuo 3'-proxiterminal es la posición preferente para un "finalizador de polimerasa".

Además, los "finalizadores de polimerasa" tales como los dados a conocer anteriormente también pueden impedir la  
25 degradación completa del oligonucleótido de detección por parte de la actividad de la exonucleasas 3'-5' termoestable dependiente de doble cadena.

Tras la utilización de un "finalizador de polimerasa" interno, puede realizarse la detección específica de alelo

con un residuo 3'-terminal discriminante marcado en el extremo 3'. En este caso, un oligonucleótido de marcaje dual según la invención contiene además un residuo nucleótido derivatizado entre el marcaje interno y el residuo 3'-  
5 terminal marcado en el extremo 3', siendo incapaz dicho nucleótido derivatizado de resultar alargado por la ADN polimerasa termoestable. En el caso de que el residuo nucleótido discriminante 3'-terminal se aparee con el ADN diana, se produce la amplificación independiente de alelo y  
10 la generación posterior de una señal específica de alelo debido a la eliminación del marcaje por parte de la exonucleasa. En el caso de el residuo nucleótido discriminante 3'-terminal NO se aparee con el ADN diana, se produce la amplificación independiente de alelo, aunque la  
15 eliminación exonucleolítica del nucleótido discriminante 3' que porta el marcaje fluorescente no resulta posible y en consecuencia, no se genera ninguna señal de detección.

Tal como se ha explicado anteriormente, la sonda de hibridación según la invención porta un primer marcaje y un  
20 segundo marcaje. El primer marcaje es capaz de actuar como entidad informadora fluorescente al ser excitada con luz de una longitud de onda apropiada, y siendo capaz el segundo marcaje de actuar como entidad extintora de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente. En principio,  
25 puede seleccionarse arbitrariamente si la entidad informadora fluorescente o la entidad extintora de fluorescencia se encuentra unida al extremo 3' del oligonucleótido de detección y cuál de estas entidades se encuentra unida internamente o en el extremo 5' de dicha

sonda de hibridación. El experto en la materia realizará esta selección según la disponibilidad de los reactivos de marcaje fluorescente para cualquiera de las alternativas indicadas.

5           La síntesis de oligonucleótidos modificados 3'-  
terminales puede realizarse mediante cualquier método  
conocido de la técnica. Pueden introducirse pigmentos  
fluorescentes mediante la utilización de un tipo especial de  
partículas de vidrio de poro controlado disponibles  
10           comercialmente en forma de matriz iniciadora de la síntesis  
de oligonucleótidos. La fluoresceína, por ejemplo, se da a  
conocer en el documento EP n° A-1 186 613. En principio, el  
segundo marcaje puede introducirse en el extremo 5' de la  
sonda de hibridación mediante métodos conocidos de la  
15           técnica. Por ejemplo, pueden acoplarse fluoróforo-  
fosforamiditas al oligonucleótido en el extremo de una  
síntesis de oligonucleótidos convencional.

          Preferentemente, sin embargo, el segundo marcaje se une  
internamente al oligonucleótido para proporcionar una  
20           vecindad espacial estrecha entre la entidad informadora  
fluorescente y la entidad extintora de fluorescencia con la  
condición de que no haya sido eliminado el marcaje 3'-  
terminal.

          En una primera realización, dicho segundo marcaje se  
25           une a una base de un residuo de dicho oligonucleótido de  
detección. Puede unirse un marcaje interno a la posición 5  
de un dU interno (Glenn Research, fluoresceína dT10-1056-  
xx). Alternativamente, puede realizarse el marcaje de bases

según la solicitud europea nº 03007844.8 (presentada el 5.4.03).

En una segunda realización, que es mutuamente exclusiva respecto a dicha primera realización, dicho segundo marcaje se une a un elemento abásico apropiado (líinker) de dicha sonda de hibridación. En este caso, el elemento básico se diseña de manera que las bases de los residuos nucleótidos vecinos puedan aparearse a dos residuos nucleótidos complementarios en el ácido nucleico diana, los cuales se encuentran separados entre sí por 1 residuo nucleótido adicional. Se dan a conocer ejemplos en la patente WO nº 97/43451.

En una tercera realización que también es mutuamente exclusiva respecto a dichas primera y segunda realizaciones, el marcaje se une al esqueleto de la cadena de nucleótidos, mediante, por ejemplo, un fosfotioato apropiado.

En general, cualquier tipo de sistema de transferencia energética por resonancia de fluorescencia (FRET) conocido de la técnica, que consiste de una pareja de donante de FRET y aceptor de FRET, puede utilizarse para proporcionar un primer marcaje apropiado y un segundo marcaje apropiado según la invención. De manera similar, si no idéntica, al formato de detección TaqMan, en todo caso es el compuesto donante de FRET que se excita con luz de una longitud de onda apropiada y se detecta en un canal de detección apropiado. Para el propósito de la presente invención, el donante de FRET se denomina "entidad informadora fluorescente". En consecuencia, el compuesto aceptor de FRET para el propósito de la presente invención se denomina

"entidad extintora de fluorescencia". En resumen, las entidades informadoras fluorescentes y entidades extintoras de fluorescencia que pueden utilizarse para la presente invención son bien conocidas por el experto en la materia.

5 Pueden utilizarse todos los pigmentos informadores TaqMan estándares, tales como FAM (detectado a 530 nm) y HEX o VIC (detectado a 560 nm). Dos otros ejemplos específicos son la combinación fluoresceína (informador) y LC-rojo 640 (Roche Applied Science) (extintor) o fluoresceína (informador) y  
10 dabculo (Molecular Probes) (extintor). En una realización específica adicional, pueden utilizarse extintores Black Hole (Biosearch Technologies) o incluso nitroindol (que es conocido como compuesto extintor) en combinación con una diversidad de diferentes entidades informadoras.

## 15 **Descripción de las figuras**

### **Figura 1**

Dibujo esquemático de un método de reacción PCR de inicio en caliente en tiempo real según la invención, caracterizado porque el oligonucleótido de detección es  
20 una sonda de hibridación.

### **Figura 2**

Seguimiento en tiempo real de una reducción de la señal FRET de LC-Rojo 640 tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. El cebador porta un marcaje interno R640 y  
25 un marcaje fluoresceína 3'-terminal. Se eliminó el marcaje terminal utilizando la exonucleasa III tras la hibridación del cebador.

### **Figura 3**

Seguimiento en tiempo real de un incremento de la fluorescencia de la fluoresceína tal como se ha dado en conocer en el Ejemplo 1. El cebador porta un marcaje R640 interno y un marcaje fluoresceína 3'-terminal. El  
5 marcaje terminal fue liberado mediante exonucleasa III tras la hibridación del cebador, conduciendo a un cambio de la señal fluorescente.

#### **Figura 4**

Tinción en gel de los productos de amplificación  
10 obtenidos en el Ejemplo 1.

1. Reacción de PCR en ausencia de exonucleasa III.
2. en presencia de 3 ng
3. en presencia de 20 ng
4. en presencia de 12,5 ng
- 15 5. en presencia de 5 ng de exonucleasa III
6. Marcador V de peso molecular de Roche Applied Science, nº de cat. 821705.

#### **Figura 5**

Reacción de PCR en tiempo real tal como se da a conocer  
20 en el Ejemplo 2. "Cebador 300.1 + 500rev + Sonda HPQ15": detección de la formación de producto con una sonda que porta una fluoresceína interna y una molécula extintora en el extremo 3'.

"Cebador 300.1 + Sonda HPQ15": detección de la  
25 formación de producto con ayuda de un cebador que porta una fluoresceína interna y una molécula extintora en el extremo 3'.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

El experimento siguiente no es un ejemplo de la invención.

Para este experimento de PCR en tiempo real, utilizando el procedimiento FRET, se diseñó un cebador marcado  
 5 doblemente que portaba un marcaje interno LC-Rojo 640 (Roche Applied Science, n° de cat. 2 015 161) y un marcaje fluoresceína 3'-terminal (Roche Applied Science n° de cat. 3 138 178). Se eliminó el marcaje terminal mediante  
 10 exonucleasa III tras la hibridación del cebador, resultando en una reducción de la señalización de LC-Rojo640 y simultáneamente un incremento de la fluorescencia de la fluoresceína.

Los cebadores eran los siguientes:

Sec Id. n° 1:

15 "βActinaHP25": CCTGGGTCATCTTCT\*\*(Rojo 640)CGCGG\*U\*TpFluos-3'  
 T\*\*(Rojo 640)=T-LCRojo 640 (se introdujo T-fosforamido amino-modificado durante la síntesis de oligonucleótidos. Posteriormente, se hizo reaccionar el  
 20 grupo amino reactivo con NHS éster de LC-Rojo 640)  
 U\*=2'-O-metil-U  
 G\*=2'-O-metil-G  
 p=fosfato  
 Fluos=Fluoresceína

25 La síntesis y el marcaje de los oligonucleótidos se llevó a cabo según protocolos estándares conocidos de la técnica.

Se prepararon reacciones de PCR con 2 µl de sondas de hibridación de mezcla de reacción LightCycler FastStart

(Roche Applied Science n° de cat. 3003248), 30 ng de ADN genómico humano (Roche Applied Science n° de cat. 1691112), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 500 nM de secuencias de cebador n°  $\beta$ Actina5.2fd, 400 nM de cebador sec. n°  $\beta$ ActinaHP25 y 2,5 unidades de polimerasa Taq sin exonucleasa III de *A. fulgidus* y con la adición de cantidades decrecientes de exonucleasa III de *A. fulgidus*, 33 ng, 20 ng, 12,5 ng y 5 ng por reacción. El volumen de reacción final de 20  $\mu$ l se ajustó con agua destilada. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un LightCycler (Roche Applied Science n° de cat. 2011468) programado siguiendo las instrucciones del manual para el usuario del fabricante. Las condiciones de PCR eran las siguientes:

1 ciclo	
60 s	95°C
45 ciclos	
0 s	95°C
10 s	60°C
15 s	72°C

Los resultados se muestran en las figuras 2, 3 y 4. Tal como puede observarse en la fig. 2, la señal de LC-Rojo 640 monitorizada en el canal F2 se redujo al incrementarse el número de ciclos. El efecto era dependiente de la dosis con respecto a la cantidad de exonucleasa III de *A. fulgidus* en la mezcla de reacción. En ausencia de exonucleasa III no se observó ninguna reducción de la fluorescencia de LC-rojo 640.

Se realizó un seguimiento de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína en el canal F1. Tal como puede observarse en la fig. 3, la señal se incrementó con un número creciente de ciclos. El efecto era dependiente de la

dosis con respecto a la cantidad de exonucleasa III de *A. fulgidus* en la mezcla de reacción. En ausencia de exonucleasa III no se observó ningún incremento de la señalización de fluoresceína.

5           Tras completarse el análisis de LightCycler, los productos de PCR se analizaron en un gel de Agarosa MS ROCHE al 3% teñido con bromuro de etidio. El resultado se muestra en la fig. 4. Únicamente pudo detectarse la presencia de exonucleasa III de *A. fulgidus*, el producto de PCR esperado  
10 de 214 pb (carriles 2 a 5). **Ejemplo**

          En otro experimento de PCR en tiempo real, se realizó un seguimiento de la reacción con una sonda oligonucleótida que portaba una fluoresceína interna y dabciilo como compuesto extintor 3'-terminal. Tras la hibridación del  
15 oligonucleótido, se eliminó el extintor terminal con exonucleasa III, resultando en una desatenuación de la señal de la fluoresceína. Los grupos informadores se encontraban situados en un oligonucleótido utilizado como sonda (reacción 1, "Cebador 300.1 + 500rev + SondaHPQ15") o,  
20 alternativamente, como cebador (reacción 2, "Cebador 300.1 + SondaHPQ15").

Las secuencias de cebador y sonda eran las siguientes:

SEC ID nº 3

"Cebador  $\beta$ Act300.1" CACCCCGTGCTGCTGACCGAp

25           p=fosfato

SEC ID nº 4

" $\beta$ -Act 500 rev" AGGGAGGCGGCCACCAGAAGp

p=fosfato

SEC ID nº 5

" $\beta$ ActinaHPQ15" CCTGGGTCATCTTCT\*

\*(Fluos)CGCGGTTpZ

p=fosfato

Z=dabcilo

5 T\*\*(Fluos)=T-fluoresceína, incorporada durante la  
síntesis de oligonucleótidos en forma de T-  
fluoresceína-fosforamidita.

Se prepararon reacciones de PCR con 2  $\mu$ l de sondas de  
hibridación de mezcla de reacción LightCycler FastStart  
10 (Roche Applied Science n° de cat. 3003248), 30 ng de ADN  
genómico humano (Roche Applied Science n° de cat. 1691112),  
MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 2,5 unidades de polimerasa Taq, 33 ng de  
exonucleasa III de *A. fulgidus*. La reacción n° 1 contenía  
500 nM de cebador Seq 300.1, 500 nM de cebador 500 rev y 500  
15 nM de sonda Sec. n° HPQ15. La reacción n° 2 contenía 500 nM  
de cebador 300.1 y 500 nM de  $\beta$ Actina HPQ15. El volumen de  
reacción final de 20  $\mu$ l se ajustó con agua destilada. Las  
reacciones de PCR se llevaron a cabo en un LightCycler  
(Roche Applied Science n° de cat. 2011468) programado  
20 siguiendo las instrucciones del manual para el usuario del  
fabricante. Las condiciones de PCR eran las siguientes:

1 ciclo	
60 s	95°C
45 ciclos	
0 s	95°C
10 s	65°C
10 s	72°C

Se realizó el seguimiento de las reacciones de PCR en  
tiempo real en el canal F1 y se observó un incremento de la  
25 señal con la formación creciente de producto de PCR. Tal  
como se muestra en la figura 5, tanto la utilización de una

sonda doblemente marcada según la invención (reacción 1, "Cebador 300.1 + 500rev + SondaHPQ15"), así como la utilización de un cebador doblemente marcado según la invención (reacción 2, "Cebador 300.1 + SondaHPQ15) resultó  
5 en una señalización de amplificación con éxito.

**Lista de referencias**

- Bernad A., *et al.*, Cell 59:219-228, 1989
- Bernard P.S., *et al.*, Analytical Biochemistry 255:101-107, 1998
- 10 Bessman M.J., *et al.*, J. Biol. Chem. 223:171-177, 1957
- Buttin G. y Kornberg A., J. Biol. Chem. 241:5419-5427, 1966
- Chien A. *et al.*, J. Bacteriol. 127:1550-1557, 1976
- Chou Q. *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:1717-1723, 1992
- EP 0 258 017
- 15 EP 0 3 007 844.8
- EP 0 439 182
- EP 0 455 430
- EP 0 547 359
- EP 0 547 920
- 20 EP 0 624 641
- EP 0 701 000
- EP 0 744 470
- EP 0 930 370
- EP-A-1 088 891
- 25 EP-A-1 186613
- EP-A-1 277 841
- EP-A-277 841
- Kainz P. *et al.*, Biotechniques 28:278-282, 2000
- Kellogg D.E. *et al.*, Biotechniques 16:1134-1137, 1994

- Lawyer F.C. *et al.*, J. Biol. Chem. 264:6427-6437, 1989
- Lin Y. y Jayasena S.D., J. Mol. Biol. 271:100-111, 1997
- Matthews J.A. y Kricka L.J., Analytical Biochemistry  
169:1-25, 1988
- 5 Moretti T. *et al.*, Biotechniques 25:716-722, 1988
- Nilsson J. *et al.*, Biotechniques 22:744-751, 1997
- Sharkey D.J. *et al.*, Biotechnology 12:506-509, 1994
- Siwek B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 16:5031-5038, 1988
- Uemori T. *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:259-265, 1993
- 10 US 4.889.818
- US 5.118.801
- US 5.210.015
- US 5.322.785
- US 5.352.778
- 15 US 5.487.972
- US 5.491.086
- US 5.538.848
- US 5.545.552
- US 5.677.152
- 20 US 5.693.502
- US 5.792.607
- US 5.804.375
- US 5.985.619
- US 6.391.551
- 25 WO 02/14555
- WO 92/09689
- WO 96/22389
- WO 97/35988
- WO 97/43451

WO 97/46706

WO 97/46707

WO 97/46712

WO 97/46714

5 WO 98/14590

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Roche Diagnostics GmbH

F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Nuevo formato de detección para la reacción en cadena  
de la polimerasa en tiempo real de inicio en caliente

<130> 21869 EP

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 1

ggattcctat gtgggcgacg 20

25 <210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

5 cctgggtcat cttctcgcgg tt 22

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 3

caccccgtgc tgctgaccga 20

<210> 4

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 4

agggaggcgg ccaccagaag 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 5

cctgggtcat cttctcgcgg tt

10

**Reivindicaciones**

1. Método para amplificar y detectar un ácido nucleico diana, que comprende:
- someter dicho ácido nucleico diana a una  
5 reacción de amplificación por PCR en tiempo real en presencia de:
    - una ADN polimerasa termoestable,
    - una exonucleasa 3'-5' termoestable dependiente de doble cadena que no es una ADN  
10 polimerasa que presente actividad correctora de errores 3'-5',
    - una pareja de cebadores de amplificación,
    - desoxinucleósidos trifosfato,
    - una sonda de hibridación que porta un  
15 primer marcaje y un segundo marcaje,
    - siendo capaz dicho primer marcaje de actuar como entidad informadora fluorescente al excitarse con luz de una longitud de onda apropiada,
    - siendo capaz dicho segundo marcaje de  
20 actuar como entidad extintora de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente,
- caracterizado porque** un marcaje se encuentra  
25 unido al extremo 3' de dicha sonda de hibridación, y **caracterizado porque** además el otro marcaje se encuentra unido internamente o en el extremo 5' a dicha sonda de hibridación,

- caracterizado porque** además dicha sonda no participa en el procedimiento de amplificación por medio del cebado de una reacción de polimerización de ADN -
- 5 realizando un seguimiento de la fluorescencia de dicha entidad informadora fluorescente por lo menos después de una pluralidad de ciclos de amplificación,
- en la que se crea una señal fluorescente
- 10 por medio de:
- la eliminación de una entidad fluorescente 3' de dicha sonda de hibridación que realiza dicha exonucleasa termoestable durante cada ciclo de amplificación.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha entidad informadora se encuentra en el extremo 3' de dicha sonda de hibridación.
3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho marcaje unido al residuo nucleótido 3'-terminal
- 20 de dicha sonda de hibridación se encuentra unido a dicho oligonucleótido mediante un grupo fosfato.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha exonucleasa 3'-5' dependiente de doble cadena se selecciona de entre un grupo que consiste de
- 25 exonucleasa III y exonucleasa IV.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho segundo marcaje se encuentra unido a una base de un residuo de dicha sonda de hibridación.

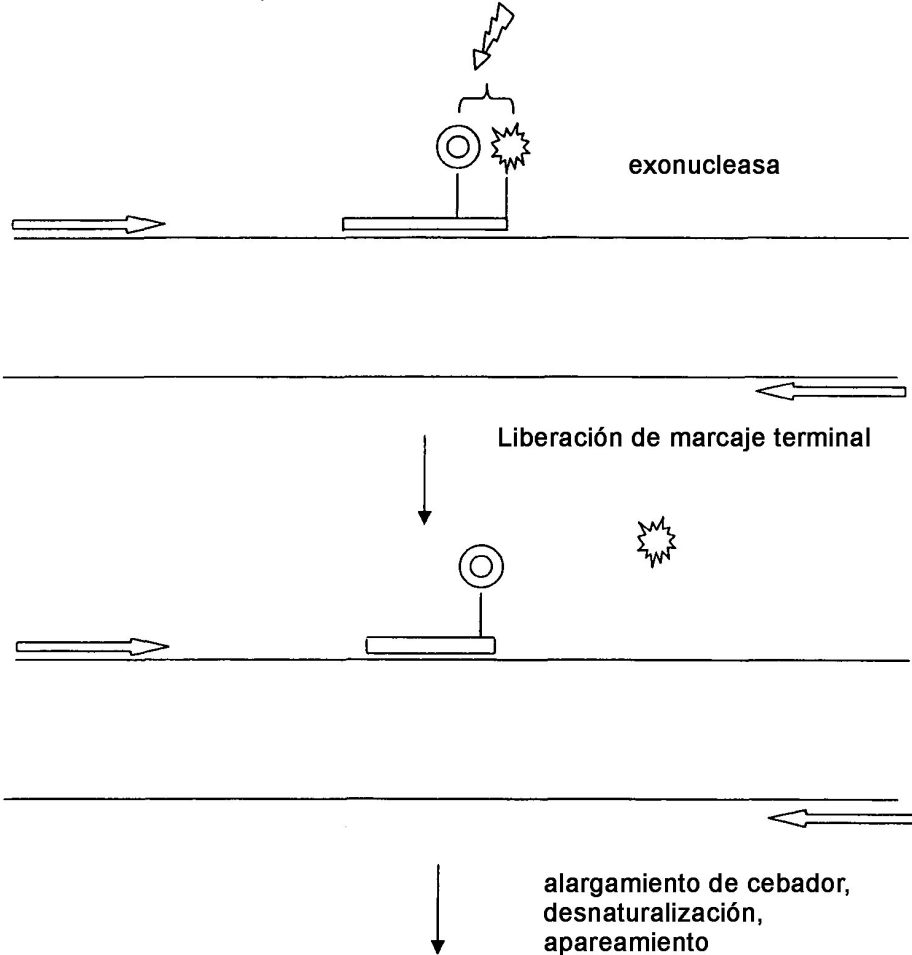
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho segundo marcaje se une a un elemento abásico de dicha sonda de hibridación.

---

**Sonda marcada**

El marcaje terminal de la sonda hibridada se libera durante la hibridación. La reacción se produce en cada etapa de apareamiento de la PCR, generando un cambio exponencial de la señal.

etapa de apareamiento durante la PCR, la sonda se hibrida con el molde



la elección de los marcajes es opcional

p.ej., procedimiento FRET Fluos+R640:

o --> incremento de la fluorescencia

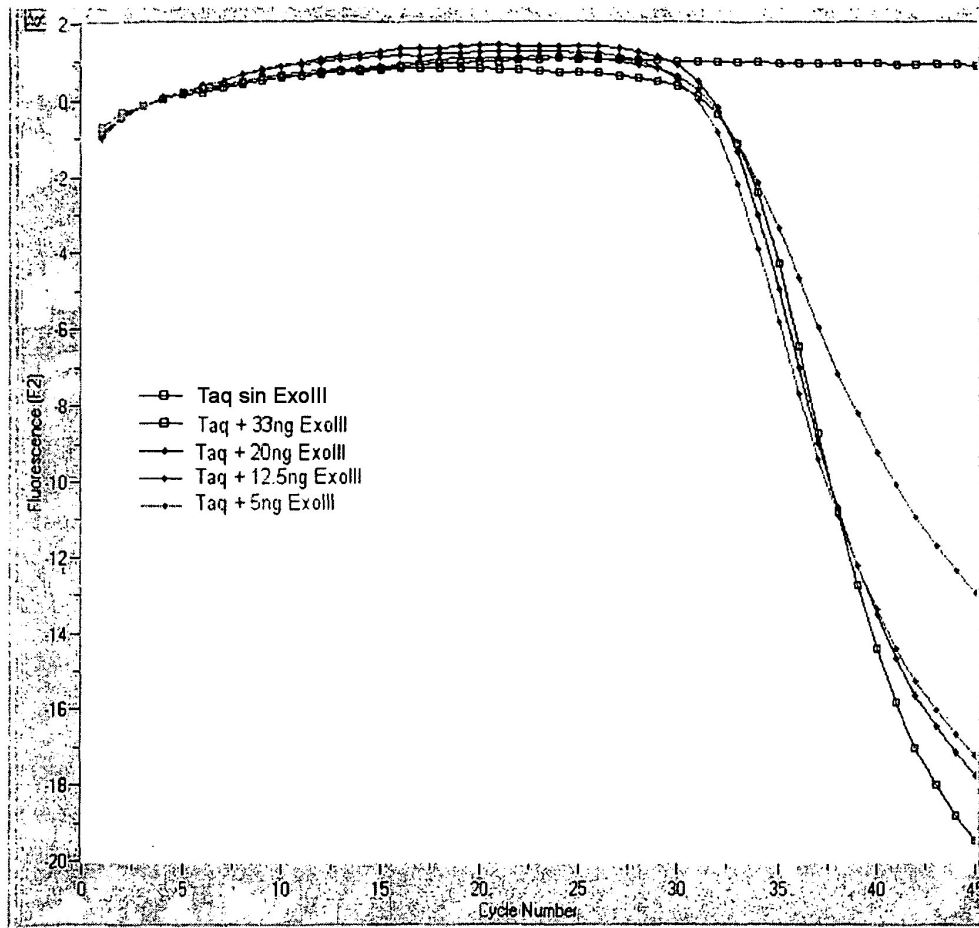
--> reducción de la señal FRET durante la PCR

p.ej. Fluos + extintor

--> incremento de fluorescencia

Fig.2

LCDA Canal F2

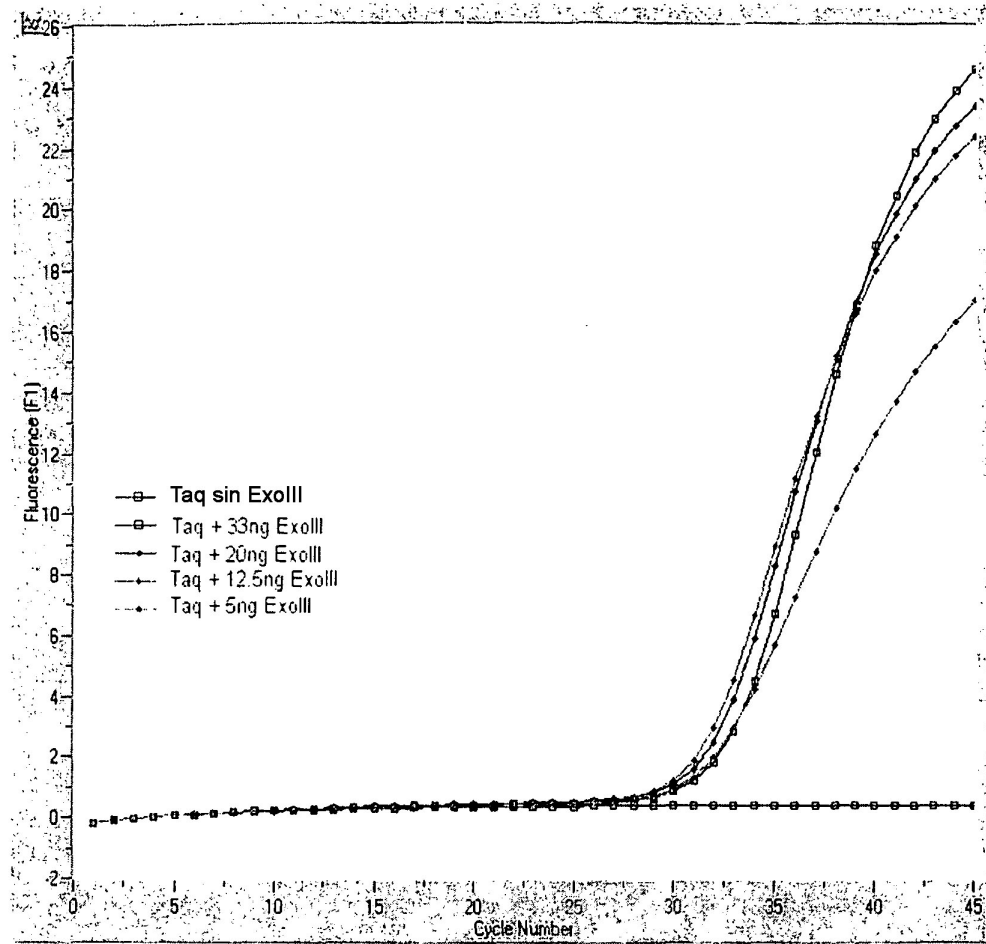


**Leyenda de la figura:**

Seguimiento en tiempo real de una reducción de la señal de FRET. El cebador porta un marcaje R640 interno y un marcaje de fluoresceína 3'-terminal. El marcaje terminal es eliminado por la exonucleasa III tras la hibridación del cebador.

Fig.3

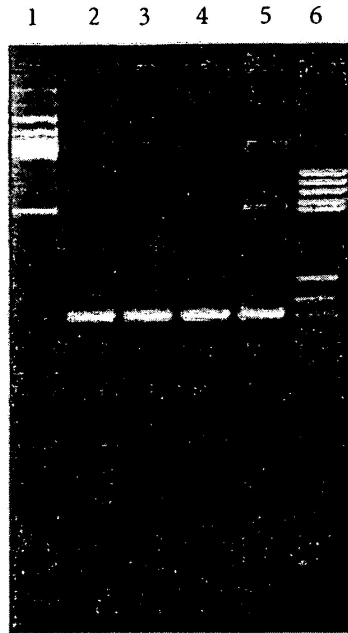
LCDA Canal F1



Legenda de la figura:

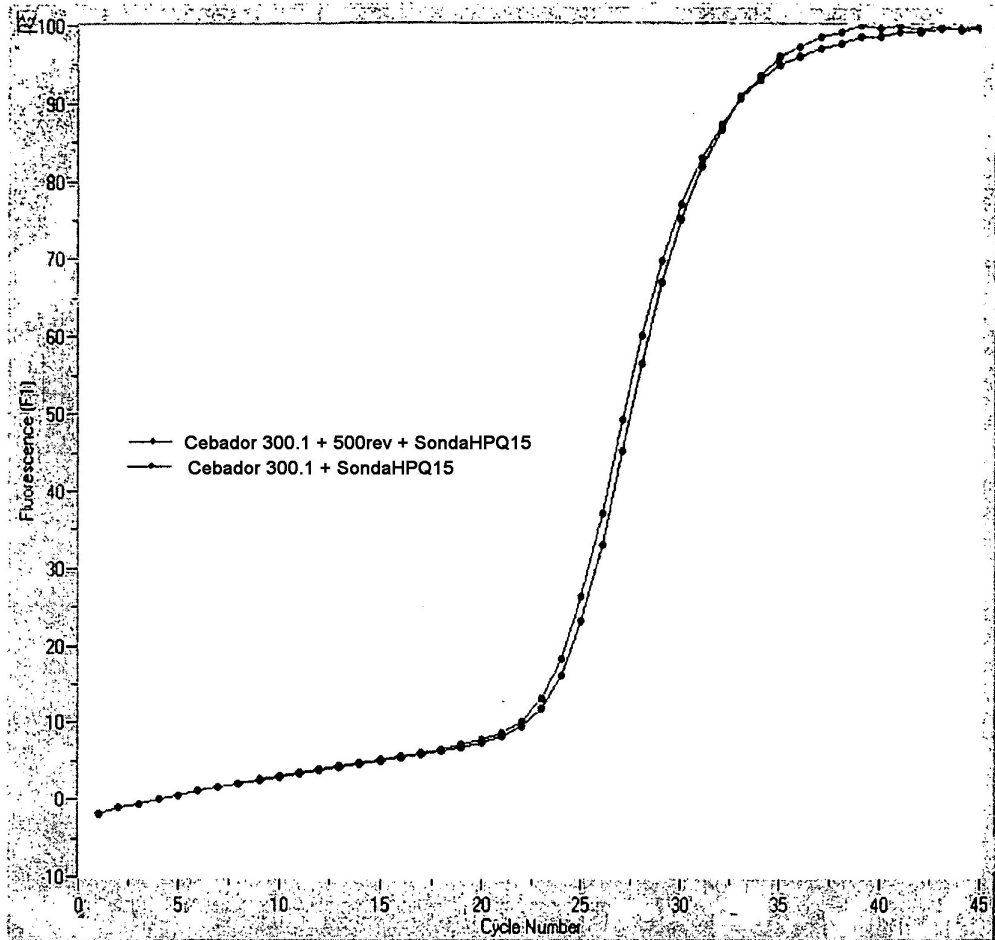
Seguimiento en tiempo real de un incremento de la fluorescencia. El cebador porta un marcaje R640 interno y un marcaje de fluoresceína 3'-terminal. El marcaje terminal es liberado por la exonucleasa III tras la hibridación del cebador, conduciendo a un cambio de la señal fluorescente.

Fig.4



7. Reacción de PCR en ausencia de exonucleasa III
8. en presencia de 33 ng
9. en presencia de 20 ng
10. en presencia de 12,5 ng
11. en presencia de 5 ng de exonucleasa III
12. Marcador V de peso molecular de Roche Applied Science, nº de cat. 821705

Fig.5



Leyenda de la figura:

Reacción nº 1, detección de la formación de producto con una sonda que porta una fluoresceína interna y una molécula extintora en el extremo 3'

Reacción nº 2, detección de la formación de producto con ayuda de un cebador que porta una fluoresceína interna y una molécula de extintor en el extremo 3'