



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 112**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02015234 .4**

96 Fecha de presentación : **09.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1277841**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **Nueva composición y método para la amplificación de ácidos nucleicos de inicio en caliente.**

30 Prioridad: **11.07.2001 EP 01115788**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.12.2009**

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

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

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 331 112 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nueva composición y método para la amplificación de ácidos nucleicos de inicio en caliente.

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, y más particularmente, a procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos. Más exactamente, la invención incrementa la especificidad de amplificación del ADN mediante la inhibición de la formación de productos de amplificación no específicos.

## Antecedentes de la técnica

10 La síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos se lleva a cabo rutinariamente con ADN polimerasas con o sin polipéptidos adicionales. Las ADN polimerasas son una familia de enzimas implicados en la replicación y reparación del ADN. Se ha llevado a cabo investigación extensa sobre el aislamiento de ADN polimerasas a partir de microorganismos mesofílicos, tales como *E. coli* (ver, por ejemplo, Bessman *et al.*, J. Biol. Chem. 223:171-177, 1957, y Buttin, G. y Kornberg, A., J. Biol. Chem. 241:5419-27, 1966).

20 También se ha llevado a cabo investigación sobre el aislamiento y la purificación de ADN polimerasas a partir de termófilos, tales como *Thermus aquaticus*. Chien, A. *et al.*, J. Bacteriol. 127:1550-7, 1976, dan a conocer el aislamiento y la purificación de una ADN polimerasa con un óptimo de temperatura de 80°C, procedente de *Thermus aquaticus* cepa YT1. La patente estadounidense n° 4.889.818 da a conocer una ADN polimerasa termoestable purificada procedente de *T. aquaticus*, la polimerasa Taq, que presenta un peso molecular comprendido entre aproximadamente 86.000 y 90.000 daltons. Además, la solicitud de patente europea n° 0 258 017 da a conocer la polimerasa Taq como el enzima preferente para la utilización en el procedimiento de la PCR.

25 La investigación ha indicado que, aunque la ADN polimerasa Taq presenta una función exonucleasa dependiente de polimerasa 5'-3', la ADN polimerasa Taq no presenta una función exonucleasa 3'-5' (Lawyer, F.C. *et al.*, J. Biol. Chem. 264:6427-37, 1989; Bernad, A. *et al.*, Cell 59:219-28, 1989). La actividad exonucleasa 3'-5' de las ADN polimerasas se denomina comúnmente "actividad de corrección de errores". La actividad exonucleasa 3'-5' elimina bases erróneamente apareadas en el extremo 3' de un dúplex cebador-molde. La actividad exonucleasa 3'-5' puede resultar ventajosa, debido a que conduce a un incremento de la fidelidad de la replicación de las cadenas de ácido nucleico y a la elongación de los productos terminados prematuramente. Debido a que la ADN polimerasa Taq no es capaz de eliminar extremos de cebador desapareados, tiende a producir errores de incorporación de bases, comportando que su utilización en determinadas aplicaciones no resulte deseable. Por ejemplo, intentar clonar un gen amplificado resulta problemático debido a que cualquier copia del gen podría contener un error debido a un suceso aleatorio de incorporación errónea. Dependiendo del ciclo en el que se produce ese error (por ejemplo en un ciclo temprano de replicación), el ADN amplificado completo podría contener la base erróneamente incorporada, dando lugar de esta manera a un producto génico mutado.

40 Existen varias ADN polimerasas termoestables conocidas de la técnica que muestran actividad exonucleasa 3'-5', por ejemplo polimerasas de tipo B procedentes de arqueobacterias termofílicas, que se utilizan para la amplificación de alta fidelidad de ADN. Las polimerasas termoestables que muestran actividad exonucleasa 3'-5' pueden aislarse o clonarse a partir de *Pyrococcus* (Purified thermostable *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase, Mathur E., Stratagene, patente WO n° 92/09689, patente US n° 5.545.552; Purified thermostable 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. 21:259-65, 1993, de *Pyrodicticum* spec. (Thermostable nucleic acid polymerase, Gelfand D.H., F. Hoffmann-La Roche AG, patente n° EP 0 624 641; Purified thermostable nucleic acid polymerase and DNA coding sequences from *Pyrodicticum*, Gelfand D.H., Hoffmann-La Roche Inc., patente US n° 5.491.086), de *Thermococcus* (por ejemplo Thermostable DNA polymerase from *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 5.322.785, patente EP n° 0 455 430; Recombinant thermostable DNA polymerase from Archaeobacteria, Comb D. G., New England Biolabs, Inc., patente US n° 5.352.778, patente EP n° 0 547 920, patente 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).

60 Otra posibilidad de proporcionar a la PCR una función de corrección de errores es la utilización de una mezcla de enzimas polimerasas, en la que una polimerasa muestra dicha actividad de corrección de errores (por ejemplo, Thermostable DNA polymerase with enhanced thermostability and enhanced length and efficiency of primer extension, Barnes W.M., patente US n° 5.436.149, patente EP n° 0 693 078; Novel polymerase compositions and uses thereof, Sorge J.A., Stratagene, patente WO n° 95/16028). Es práctica común utilizar una formulación de ADN polimerasa termoestable que comprende un componente mayoritario de por lo menos una ADN polimerasa termoestable que no presente actividad exonucleasa 3'-5' y un componente minoritario que muestre actividad exonucleasa 3'-5', por ejemplo polimerasa Taq y ADN polimerasa Pfu. En estas mezclas, la capacidad de procesamiento procede del enzima pol de tipo I, por ejemplo la polimerasa Taq, y la función de corrección de errores procede de la polimerasa de tipo B termoestable, por ejemplo Pfu.

La síntesis de alta fidelidad de ADN es un parámetro deseable en la amplificación de ácidos nucleicos, otra característica importante es la posibilidad de descontaminación. La reacción en cadena de la polimerasa puede amplificar una única molécula más de mil millones de veces. De esta manera, incluso cantidades minúsculas de un contaminante pueden amplificarse y conducir a un resultado falsamente positivo. Dichos contaminantes con frecuencia son productos anteriores de la amplificación por PCR (contaminación por arrastre). Por lo tanto, los investigadores han desarrollado métodos para evitar este tipo de contaminación. El procedimiento se basa en sustituir dUTP por TTP durante la amplificación por PCR, produciendo ADN que contiene uracilo (ADN-U). Mediante el tratamiento de mezclas posteriores de reacción de PCR con ADN-uracilo-glucosilasa (UNG) antes de la amplificación por PCR se degrada el ácido nucleico contaminante, que ya no resulta adecuado para la amplificación. Puede incorporarse dUTP con facilidad mediante polimerasas termoestables de tipo polI, pero no polimerasas de tipo B (Slupphaug G. *et al.*, Anal. Biochem. 211:164-9, 1993). La baja incorporación de dUTP por las polimerasas de tipo B limita su utilización a laboratorios en los que se analiza repetidamente el mismo tipo de molde mediante amplificación por PCR.

También se aislaron las ADN polimerasas termoestables que mostraban actividad exonucleasa 3'-5' a partir de cepas eubacterianas como *Thermotoga* (Thermophilic DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana*, Slater M. R. *et al.*, Promega Corporation, patente WO n° 96/41041; Cloned DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana* and mutants thereof, Hughes A.J. *et al.*, Life Technologies, Inc., patente WO n° 96/10640; Purified thermostable nucleic acid polymerase enzyme from *Thermotoga maritima*, Gelfand D. H. *et al.*, CETUS Corporation, patente WO n° 92/03556). Dichos enzimas presentan una fuerte actividad exonucleasa 3'-5' que es capaz de eliminar las bases erróneamente incorporadas o desapareadas. Una versión genéticamente manipulada de dicho enzima se encuentra disponible comercialmente denominada ULTma, que es una ADN polimerasa que puede utilizarse sin polipéptidos adicionales para el procedimiento de PCR. Este enzima es capaz de eliminar las bases erróneamente incorporadas, de incorporar dUTP, aunque la fidelidad es, por motivos desconocidos, no superior a la de la polimerasa Taq (Accuracy of replication in the polymerase chain reaction, Diaz R.S. y Sabino E.C., Braz. J. Med. Biol. Res. 31:1239-42, 1998; PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, Cline J. *et al.*, Nucleic Acids Res. 24:3546-51, 1996).

También existe un sistema de PCR de alta fidelidad que preferentemente es capaz de incorporar concomitantemente dUTP. Según el documento EP n° A-1088891, puede utilizarse un enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3', aunque esencialmente ninguna actividad de ADN polimerasa, incrementando la fidelidad del procedimiento de amplificación al añadirse a un segundo enzima que muestra actividad de polimerasa. De esta manera, el enzima puede cortar extremos desapareados de cebador para permitir que el segundo enzima, que muestra actividad de polimerasa, tal como, por ejemplo, la polimerasa Taq, se reasocie y reanude la elongación durante un proceso de síntesis de ADN. El enzima también requiere la capacidad de cooperar a modo de enzima corrector de errores con un segundo enzima que muestra actividad de polimerasa. Resulta especialmente adecuado para esta tarea, por ejemplo, la exonucleasa termoestable III. Resulta preferente la exonucleasa III que trabaja en la dirección 3' a 5', cortando 5' respecto al fosfato y dejando grupos hidroxilo 3' e idealmente trabajando únicamente sobre ADN bicatenario.

Evidentemente resulta ventajoso que el enzima se encuentre activo a una temperatura de entre 70°C y 80°C, sea suficientemente estable para sobrevivir al ciclo de desnaturalización y sea inactivo a temperaturas inferiores, para no degradar los productos de PCR tras completar el procedimiento de PCR. Los enzimas que muestran dichas características pueden derivarse a partir de eubacterias termofílicas o de enzimas relacionados procedentes de arqueobacterias termofílicas. Se han secuenciado los genomas de tres arqueobacterias termoestables: *Methanococcus jannaschii* (Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*, Bult C.J. *et al.*, Science 273:1058-73, 1996), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Complete genomic sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* H: Functional Analysis and Comparative Genomics, Smith D.R. *et al.*, J. Bacteriol. 179:7135-55, 1997) y *Archaeoglobus fulgidus* (The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, Klenk H.P. *et al.*, Nature 390:364-70, 1993).

En particular, el documento EP n° A-1088891 da a conocer un enzima termoestable que puede obtenerse de *Archaeoglobus fulgidus*, que cataliza la degradación de extremos erróneamente apareados de cebadores o de polinucleótidos en la dirección 3' a 5' de ADN bicatenario. El gen codificante de la exonucleasa termoestable III que puede obtenerse de *Archaeoglobus fulgidus* (Afu) se clonó, se expresó en *E. coli* y se aisló. El enzima se encuentra activo bajo las condiciones de incubación y temperatura utilizadas en las reacciones de PCR. El enzima da soporte a ADN polimerasas tales como Taq durante la síntesis de ADN con tasas de error bajas y a la síntesis de productos mayores de 3 kb en ADN genómico (en el intervalo superior de los productos sintetizados por la polimerasa Taq) con buenos rendimientos en presencia o no de dUTP en la mezcla de reacción. Preferentemente se utilizaron entre 50 y 500 ng de exonucleasa III que puede obtenerse de Afu por cada 2,5 U de polimerasa Taq para obtener un rendimiento óptimo de la PCR. Más preferentemente se utilizan entre 67 ng y 380 ng de exonucleasa III que puede obtenerse de Afu por cada 2,5 U de la polimerasa Taq en la reacción de PCR.

Otro problema importante de la amplificación de ácidos nucleicos, y más especialmente de la PCR, es la generación de productos de amplificación no específica. En muchos casos, lo anterior se debe a cebadores oligonucleótidos no específicos y a la extensión posterior del cebador antes del procedimiento de termociclado mismo, debido a que las ADN polimerasas termoestables también son moderadamente activas a temperatura ambiente. Por ejemplo, con frecuencia se observan productos de amplificación que aparecen debido a la dimerización aleatoria de cebadores y su posterior extensión. Para superar este problema, es bien conocida de la técnica la realización de una PCR denominada

## ES 2 331 112 T3

“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 estado inactivo hasta el primer incremento de temperatura de la mezcla de reacción. Debido a que la polimerasa no puede funcionar bajo estas condiciones, no se produce la elongación de los cebadores durante este periodo en el que los cebadores pueden unirse no específicamente. Con el fin de conseguir dicho efecto, se han puesto en práctica 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 mayoría de los demás reactivos. Durante la primera etapa de calentamiento, se funde automáticamente la cera y se mezclan los compartimientos fluidos (Chou Q. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20:1717-23, 1992). Alternativamente, la ADN polimerasa se inmoviliza por afinidad sobre un soporte sólido antes de la reacción de amplificación y únicamente se libera en la mezcla de reacción mediante liberación mediada por calor (Nilsson J. *et al.*, *Biotechniques* 22:744-51, 1997). Sin embargo, ambos métodos resultan laboriosos y de realización poco conveniente.

### b) Modificación química de la 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 bloqueantes termolábiles en la ADN polimerasa Taq, que provocan que el enzima sea inactivo a temperatura ambiente. Estos grupos bloqueantes se eliminan a temperatura elevada durante una etapa anterior a la PCR, de manera que se active el enzima. Dicha modificación termolábil puede conseguirse, por ejemplo, mediante acoplamiento de anhídrido citracónico o de anhídrido aconítrico a los residuos lisina del enzima (patente US nº 5.677.152). Los enzimas que incluyen dichas modificaciones se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo Amplitaq Gold (Moretti T. *et al.*, *Biotechniques* 25:716-22, 1998) o la 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 químicamente modificadas puede variar y prácticamente no puede controlarse.

### c) Inhibición de la ADN polimerasa por aditivos ácidos nucleicos

La extensión de cebadores hibridados no específicamente se ha demostrado que resulta inhibida por la adición de fragmentos cortos de ADN bicatenario (Kainz P. *et al.*, *Biotechniques* 28:278-82, 2000). En este caso, la extensión de los cebadores resulta inhibida a temperaturas inferiores al punto de fusión del fragmento corto de ADN bicatenario, aunque independientemente de la secuencia del ADN competidor mismo. Sin embargo, no se conoce el grado en que el exceso de ADN competidor influye sobre el rendimiento de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Alternativamente, pueden utilizarse oligonucleótidos aptámeros con una secuencia específica que resulta en una estructura secundaria definida. Dichos aptámeros se han seleccionado utilizando la tecnología SELEX para que presenten una afinidad muy elevada para la ADN polimerasa (patente US nº 5.693.502) (Lin Y. y Jayasena S. D., *J. Mol. Biol.* 271:100-11, 1997). La presencia de dichos aptámeros en la mezcla de amplificación antes del procedimiento de termociclado mismo nuevamente resulta en una unión de afinidad elevada con la ADN polimerasa y en consecuencia en una inhibición termolábil de la actividad de la misma. Sin embargo, debido al procedimiento de selección, la totalidad de los aptámeros disponibles en la actualidad únicamente pueden utilizarse en combinación con una especie particular de ADN polimerasa.

### d) Anticuerpos de ADN Taq

Un enfoque alternativo para conseguir la inhibición termolábil de la ADN polimerasa Taq es la adición de anticuerpos monoclonales cultivados contra el enzima purificado (Kellogg D.E. *et al.*, *Biotechniques* 16:1134-7, 1994; Sharkey D.J. *et al.*, *Biotechnology (NY)* 12:506-9, 1994). Al igual que los oligonucleótidos aptámeros, el anticuerpo se une a la ADN polimerasa Taq con elevada afinidad a temperatura ambiente en un modo inhibitorio. El complejo se resuelve en una etapa de precalentamiento antes del procedimiento de termociclado mismo. Lo anterior conduce a una prolongación sustancial y de larga duración de la amplificación en su conjunto, especialmente en el caso de que se pongan en práctica protocolos de termociclado rápido (patente WO nº 97/46706).

La patente US nº 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, aparte de la polimerasa Taq, se añade, por ejemplo, la exonucleasa III de *E. coli* como suplemento de la mezcla de amplificación con el fin de digerir los intermediarios dímeros no específicos de los cebadores. Tal como se ha dado a conocer anteriormente, la exonucleasa III reconoce ADN bicatenario como sustrato, tal como, por ejemplo, híbridos diana/cebador o 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, todos los cebadores hibridados no específicamente y, por lo tanto, los productos de extensión de los cebadores, resultan digeridos. Lo anterior resulta, en algunas realizaciones, incluso en una especificidad incrementada de la reacción de amplificación. Sin embargo, la digestión de cebadores no específicos dependiente de la duración del periodo de preincubación puede conducir a una reducción sustancial y no controlada de la concentración de los cebadores, que, a su vez, podría afectar a la reacción de amplificación misma.

#### 10 e) Utilización de exonucleasas

Otra alternativa para incrementar la eficiencia de la amplificación es la utilización de cebadores oligonucleótidos fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de reacción de PCR (patente EP nº 0 744 470). En este caso, una exonucleasa 3', que habitualmente acepta sustratos de ADN tanto bicatenarios como monocatenarios, degrada los artefactos dúplex, tales como los cebadores dímeros, así como los amplicones contaminantes, dejando sin degradar los cebadores de amplificación monocatenarios. Alternativamente, se ha sugerido combinar una ADN polimerasa termoestable primaria y una ADN polimerasa termoestable secundaria que presente una actividad exonucleasa 3' a 5', para amplificar secuencias de ácidos nucleicos largas mediante PCR "de inicio en caliente" (patente EP nº 0 669 401). De manera similar, se ha sugerido utilizar cebadores con extremos 3' modificados abásicos y la eliminación dependiente de molde por parte de la endonucleasa IV de *E. coli* (patente US nº 5.792.607). Sin embargo, existen varias desventajas importantes en dichos métodos:

en primer lugar, los oligonucleótidos que contienen residuos fosforotioato no pueden sintetizarse en un modo estereoisoméricamente puro. Además, las temperaturas de hibridación de los mismos son diferentes en comparación con los oligonucleótidos no modificados de la misma secuencia y con frecuencia se observan sucesos de hibridación no específica.

En segundo lugar, los cebadores que contienen residuos fosforotioato en los extremos 3' todavía pueden ser elongados por la ADN polimerasa, que ya se encuentra presente en la mezcla de reacción. En otras palabras, el efecto de la exonucleasa resulta 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. 16:5031-8, 1988). Sin embargo, dependiendo del tipo específico de ensayo, una concentración significativa precisa de  $Mg^{++}$  es una condición necesaria esencial para una reacción PCR de amplificación con éxito, lo que provoca que la aplicación de una endonucleasa IV en una muestra para PCR resulte bastante ineficaz.

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 se encuentran activas antes del procedimiento de termociclado mismo. En consecuencia, la unión y la extensión de cebadores no específicos únicamente resultan inhibidas antes, pero no durante, el procedimiento de ciclado térmico mismo.

En vista de la técnica anterior descrita de manera general, es un objetivo de la invención proporcionar una composición y un método alternativos para la PCR de inicio en caliente, que permita la inhibición del proceso de cebado y de la extensión de cebadores no específicos, no sólo antes del procedimiento de amplificación mismo, sino también durante el procedimiento de termociclado. Más exactamente, es un objetivo de la invención proporcionar una composición y un método alternativos para la PCR de inicio en caliente en la que no pueda tener lugar la extensión de cebadores hibridados no específicamente.

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

La nueva invención proporciona una composición para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:

- 55 - una ADN polimerasa termoestable,
- una exonucleasa 3'-5' termoestable, y
- 60 - por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3' terminal modificado que no resulta elongado por dicha ADN polimerasa termoestable.

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. La exonucleasa termoestable puede ser un homólogo de exonucleasa III o una ADN polimerasa mutada con actividad reducida o nula de polimerasa.

En una realización específica que resulta útil para el análisis de PCR en tiempo real, la composición puede comprender además un compuesto para la detección del producto de amplificación.

## ES 2 331 112 T3

Con respecto a los cebadores de amplificación resulta preferente que por lo menos un cebador se modifique en el extremo 3' con un grupo fosfato o con un grupo químico unido al desoxinucleótido 3' terminal mediante un grupo fosfato. Alternativamente, el residuo 3' terminal es un dideoxinucleótido o cualquier otro nucleótido modificado o análogo de nucleótido que no pueda ser elongado por una ADN polimerasa. En otra realización, el nucleótido 3' terminal puede sustituirse por un modificador no nucleósido o por un sitio abásico.

La nueva invención también se refiere a kits que comprenden una composición tal como se ha dado a conocer anteriormente, o kits que comprenden recipientes de almacenamiento separados para una ADN polimerasa termoestable, una 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 elongado por dicha ADN polimerasa termoestable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para llevar a cabo una amplificación de un ácido nucleico molde, que comprende:

a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende por lo menos un cebador que se modifica en el extremo 3' terminal del mismo, de manera que dicho cebador no resulte elongado por una ADN polimerasa termoestable,

b) eliminar dicha modificación sin adición de componentes adicionales de la mezcla de reacción mediante la elevación de la temperatura de dicha mezcla de reacción,

c) amplificar el ácido nucleico molde

Preferentemente, el residuo 3' terminal de por lo menos un cebador resulta eliminado por una exonucleasa termoestable. Más preferentemente, dicho método según la invención puede llevarse a cabo utilizando una composición tal como se ha dado a conocer anteriormente.

### Descripción detallada

La nueva invención proporciona un nuevo concepto de PCR de inicio en caliente para superar los problemas de todos los métodos de inicio en caliente conocidos de la técnica. Se basa principalmente en la posibilidad de impedir la elongación 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 proporcionar accesibilidad al cebador a temperaturas de elongación típicas en la PCR, el concepto incluye la utilización de una exonucleasa termoestable que resulte inactiva a temperatura ambiente o inferior, no afectando de esta manera al cebador modificado a estas temperaturas. Con el incremento de 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.

Preferentemente, dicha actividad exonucleasa es una exonucleasa 3' a 5' que reconozca 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 reconocen ADN bicatenario con un extremo 5' protuberante como sustrato preferente y son especialmente capaces de digerir el extremo 3' recesivo del sustrato en la dirección 3' a 5'.

En un primer aspecto, la nueva invención proporciona una composición para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende:

a) una ADN polimerasa termoestable,

b) una exonucleasa 3'-5' termoestable, y

c) por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3' terminal modificado que no resulta elongado por dicha ADN polimerasa termoestable.

La polimerasa termoestable como el primer componente puede ser cualquier tipo de ADN polimerasa dependiente de ADN o de ARN, preferentemente polimerasa Taq procedente de *Thermus aquaticus*. En una realización específica, se utiliza una mezcla de polimerasas termoestables, en las que una polimerasa Taq proporciona una capacidad de procesamiento elevada y un segundo enzima proporciona actividad de corrección de errores (por ejemplo ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1732641).

La exonucleasa termoestable como segundo componente preferentemente s un homólogo de la exonucleasa III que puede originarse a partir de cualquier organismo termoestable. En el contexto de la presente invención, un homólogo de exonucleasa III se define como un enzima que reconoce ADN bicatenario con un extremo 5' protuberante como sustrato y que es capaz de eliminar los residuos nucleótidos del extremo 3' recesivo. Además, 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 todavía más preferentemente más de 90%, de su actividad tras 60 minutos de incubación a 70°C. 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

## ES 2 331 112 T3

a 37°C es, en cualquier caso, inferior comparada con la actividad enzimática a cualquier temperatura comprendida entre 37°C y 72°C. La temperatura óptima para el enzima, en consecuencia, puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre 50°C y 85°C.

5 Recientemente se ha dado a conocer un homólogo de exonucleasa III termoestable procedente de *Archaeoglobus fulgidus* (ExoIII-Afu) (documento EP nº A-1088891), que resulta especialmente adecuado para los protocolos de inicio en caliente según la invención. La ventaja de la utilización de dicho enzima en comparación con otros enzimas es que:

- el enzima está claramente activo preferentemente en ADN bicatenario, y

10

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

15 Alternativamente, la exonucleasa 3'-5' termoestable puede ser una ADN polimerasa mutada con actividad de polimerasa nula o sustancialmente reducida, aunque con actividad 3'-exonucleasa suficientemente elevada. La actividad reducida de ADN polimerasa en este contexto significa menos de 50% de actividad de ADN polimerasa en un enzima que muestra actividad de ADN polimerasa.

20 El tercer componente de la composición inventiva es un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3' terminal modificado que no resulta elongado por dicha ADN polimerasa termoestable. Preferentemente, ambos cebadores de amplificación se modifican de manera que no puedan ser elongados por las ADN polimerasas. Sin embargo, tal como se muestra en los ejemplos, también resulta suficiente en el caso de que únicamente se modifique en el extremo 3' un cebador de entre una pareja de cebadores. Para las aplicaciones multiplex, en las que se genera más de un producto de amplificación específico a partir de una muestra en el mismo recipiente de reacción, la invención

25

requiere que se modifique por lo menos un cebador de cada ácido nucleico diana que debe amplificarse. Resulta preferente la modificación en el extremo 3' de por lo menos un cebador utilizando un grupo fosfato o un grupo químico unido al desoxinucleótido 3' terminal mediante un grupo fosfato. A partir de los resultados derivados de la utilización de diversas modificaciones 3' terminales diferentes, aparentemente resulta razonable concluir que la

30

exonucleasa III termoestable o los homólogos de la misma pueden cortar enlaces de grupo fosfato en el extremo 3' terminal de un oligonucleótido. En este contexto, el grupo químico unido mediante el grupo fosfato al cebador no afecta sustancialmente a la eficiencia de la reacción.

35 Alternativamente a la modificación con un grupo fosfato, pueden unirse otros grupos químicos al extremo 3' del cebador, que impiden la extensión del mismo. El grupo químico puede ser un nucleósido o un análogo de nucleósido que impide la elongación por la polimerasa. Sin embargo, no existe ninguna limitación respecto a la entidad 3' bloqueante, debido a que únicamente resulta esencial que exista un grupo fosfato contiguo que pueda resultar atacado por el enzima exonucleasa III.

40 Por ejemplo, el residuo 3' terminal puede ser un dideoxinucleótido. En este caso, aparentemente resulta probable que el residuo dideoxinucleótido 3' terminal completo se corte del cebador con un homólogo de la exonucleasa III termoestable. Aparentemente lo anterior también tiene lugar en todavía otra realización de la invención, en la que el residuo 3' terminal mismo resulta modificado con una entidad química no conectada a un grupo fosfato, en el que, sin embargo, el oligonucleótido no puede ser elongado por una reacción de ADN polimerasa.

45

Entre otras modificaciones 3' terminales en el grupo fosfato, por ejemplo, se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, espaciadores alquilo, por ejemplo espaciadores propilo, o 2'-tercbutilsilil-nucleósidos. Además, la modificación 3' también puede consistir de más de un modificador.

50 La síntesis de cebadores oligonucleótidos 3' terminales modificados puede realizarse mediante cualquier método conocido de la técnica. Por ejemplo, pueden introducirse grupos fosfato mediante la utilización de un tipo especial de partícula de vidrio de poro controlado como matriz iniciadora para la síntesis de oligonucleótidos (Glen Research, nº de cat. 20-2900-xx). Los dideoxinucleótidos preferentemente pueden introducirse mediante una reacción enzimática utilizando el enzima transferasa terminal o mediante la utilización de 2',3'-dideoxi-CPG, disponible comercialmente

55

(Glen Research, nº de cat. 20-2017-xx). En una realización específica, puede utilizarse la composición inventiva para el seguimiento de la PCR en tiempo real. Por ejemplo, la composición puede comprender además uno o más compuestos con el fin de detectar el producto de amplificación, por ejemplo una o más sondas de hibridación de ácidos nucleicos marcados, en el que el marcaje, pro ejemplo, es marcaje fluorescente.

60

65 Alternativamente, la composición puede comprender un pigmento de unión de ADN bicatenario fluorescente. Debido a que la cantidad de producto de amplificación bicatenario habitualmente excede la cantidad de ácido nucleico originalmente presente en la muestra que debe analizarse, pueden utilizarse pigmentos específicos de ADN bicatenario, que tras la excitación con una longitud de onda apropiada, muestran una fluorescencia incrementada únicamente si se encuentran unidos a ADN bicatenario. Preferentemente, únicamente pueden utilizarse aquellos pigmentos que, como SYBR GreenI (Molecular Probes), por ejemplo, no afectan a la eficiencia de la reacción de PCR.

## ES 2 331 112 T3

Con respecto a la utilización de sondas de hibridación marcadas fluorescentemente, existen diferentes posibilidades:

5 en primer lugar, puede utilizarse una sonda de hibridación TaqMan monocatenaria, que se marca con una entidad fluorescente, la emisión de fluorescencia de la cual se extingue con un segundo marcaje en la misma sonda, que puede actuar como compuesto extintor. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda se hibrida con la secuencia diana de la misma y, posteriormente, durante la extensión del cebador, la ADN polimerasa que presenta una actividad exonucleasa 5'-3' digiere la sonda de hibridación en fragmentos más pequeños, de manera que la entidad fluorescente se separa del compuesto extintor. Tras la excitación apropiada, puede realizarse el seguimiento de la emisión fluorescente a modo de indicador de la acumulación de producto de amplificación (patente US nº 5.210.015).

15 En segundo lugar, de manera similar a las sondas TaqMan, se marca un oligonucleótido Sonda Fluorescible utilizando un compuesto fluorescente y un compuesto extintor, que, debido a la estructura secundaria de la molécula, se encuentran en estrecha proximidad. Tras la unión al ADN diana, se rompen los enlaces de hidrógeno intramoleculares, y el compuesto fluorescente situado en un extremo de la sonda se separa del compuesto extintor, que se encuentra situado en el extremo opuesto de la sonda (Lizardi *et al.*, patente US nº 5.118.801).

20 En tercer lugar, pueden utilizarse dos sondas oligonucleótidas de hibridación, marcada cada una con un grupo fluorescente, que sean capaces de hibridarse con regiones contiguas aunque no solapantes de una cadena del producto de amplificación. Preferentemente se marca un oligonucleótido en el extremo 5' y el segundo oligonucleótido se marca en el extremo 3' (patente US nº 6.174.670). Durante la hibridación con el ADN diana, los dos marcajes fluorescentes se encuentran en contacto estrecho, de manera que puede tener lugar la transferencia de energía por resonancia fluorescente entre los dos grupos fluorescentes. Como consecuencia, puede realizarse el seguimiento de la hibridación a partir de la excitación del grupo donante y la medición posterior de la emisión fluorescente del segundo grupo aceptor. En una realización similar, se utiliza únicamente una sonda marcada fluorescentemente, que conjuntamente con un cebador apropiadamente marcado también puede servir como pareja específica en la técnica FRET (transferencia de energía resonante fluorescente) (Bernard P.S. *et al.*, Anal. Biochem. 255:101-7, 1998).

30 Para los formatos de PCR en tiempo real basados en la utilización de una o más sondas de hibridación, la presencia de una exonucleasa III termoestable requiere un método de bloqueo adecuado para el extremo 3' de la sonda o sondas de detección con el fin de evitar la digestión del extremo 3'. Al contrario que los cebadores de amplificación, las sondas de hibridación no resultan elongadas durante la reacción de PCR, de manera que la eliminación de los residuos en la dirección 3'-5' inactivaría la sonda.

35 Se han encontrado diferentes métodos de bloqueo adecuados: por ejemplo la introducción de dos nucleótidos 2'-metoxi en el extremo 3' de la sonda resulta en la resistencia a la exonucleasa III de la sonda o sondas. Por el contrario, la sustitución adicional de dos bases 3' por 2'-terc-butilsilil-nucleósidos no resulta en una resistencia incrementada a nucleasas. Por lo tanto, resulta razonable que, en el caso de las modificaciones 2', únicamente se produzca una resistencia incrementada a exonucleasas en el caso de que los residuos nucleótidos modificados sean capaces de hibridarse con la cadena complementaria. Por lo tanto, las modificaciones 2' que no influyen drásticamente sobre la hibridación resultan adecuadas para el propósito de la presente invención.

45 Evidentemente la estabilización de la sonda no se encuentra limitada a modificaciones 2'. Otro enfoque consistente con la invención es la utilización de oligonucleótidos o quimeras oligonucleótidas con esqueletos parcial o totalmente modificados. El experto en la materia podrá seleccionar fácilmente diferentes modificaciones que son bien conocidas de la tecnología antisentido. Por ejemplo, algunas modificaciones del esqueleto, tales como fosfotioatos o metilfosfonatos también resultan en una resistencia incrementada a nucleasas.

50 Un ejemplo adicional es la utilización de análogos C-nucleósidos como residuos 3' terminales. Los C-nucleósidos se han dado a conocer en detalle en la patente US nº 6.174.998.

La nueva invención también se refiere a kits que comprenden una composición que contiene:

- 55 a) una ADN polimerasa termoestable,  
b) una exonucleasa 3'-5' termoestable,  
60 c) por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3' terminal modificado que no resulta elongado por dicha ADN polimerasa termoestable.

Alternativamente, un kit según la invención puede comprender recipientes de almacenamiento separados para una ADN polimerasa termoestable, una 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 elongado por dicha ADN polimerasa termoestable. También se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención que dos de los tres componentes mencionados anteriormente se mantengan dentro de un recipiente de almacenamiento.

## ES 2 331 112 T3

Además, dichos kits pueden comprender tampones o reactivos adicionales adecuados para las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, tales como desoxinucleósidos trifosfato. Los kits también pueden contener reactivos para la detección de los productos de amplificación, tales como pigmentos de unión de ADN bicatenario, por ejemplo SybrGreenI (Molecular Probes) o sondas oligonucleótidas de hibridación.

5

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para llevar a cabo una amplificación de un ácido nucleico molde, que comprende:

10 a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende por lo menos un cebador que se encuentra modificado en su residuo 3' terminal de manera que dicho cebador no resulta elongado por una ADN polimerasa termoestable,

b) eliminar dicha modificación sin la adición de componentes adicionales de la mezcla de reacción mediante la elevación de la temperatura de dicha mezcla de reacción,

15 c) amplificar el ácido nucleico molde.

Preferentemente, el residuo 3' terminal de por lo menos un cebador se elimina con una exonucleasa termoestable. Más preferentemente, puede llevarse a cabo dicho método según la invención utilizando una composición según la invención.

20

Alternativamente, puede inducirse térmicamente la eliminación de dicha modificación en el caso de que el líncr entre el residuo 3' terminal y la modificación sea termolábil.

25 Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe interpretarse que pueden realizarse modificaciones de los procedimientos proporcionados sin apartarse del espíritu de la invención.

### 30 Descripción de las figuras

Figura 1

*Inducción Exo-Start de PCR con cebadores 3'-P-bloqueados, exonucleasa III Afu y ADN polimerasa Taq*

35

- |    |     |                      |                                     |
|----|-----|----------------------|-------------------------------------|
| IV | 1.  | Roche MWM/II         |                                     |
|    | 2.  | Cebador no bloqueado | 2,5 U de Taq                        |
| 40 | 3.  | Cebador no bloqueado | 2,5 U de Taq y 38 ng de ExoIII-Afu  |
|    | 4.  | Cebador no bloqueado | 2,5 U de Taq y 76 ng de ExoIII-Afu  |
| 45 | 5.  | Cebador no bloqueado | 2,5 U de Taq y 101 ng de ExoIII-Afu |
|    | 6.  | Cebador no bloqueado | 2,5 U de Taq y 152 ng de ExoIII-Afu |
| 50 | 7.  | Cebador bloqueado    | 2,5 U de Taq                        |
|    | 8.  | Cebador bloqueado    | 2,5 U de Taq y 38 ng de ExoIII-Afu  |
| 55 | 9.  | Cebador bloqueado    | 2,5 U de Taq y 76 ng de ExoIII-Afu  |
|    | 10. | Cebador bloqueado    | 2,5 U de Taq y 101 ng de ExoIII-Afu |
| 60 | 11. | Cebador bloqueado    | 2,5 U de Taq y 152 ng de ExoIII-Afu |
|    | 12. | Roche MWM/II         |                                     |

65

## ES 2 331 112 T3

Figura 2

*Inducción Exo-Start de PCR con cebadores 3'-P-bloqueados, exonucleasa III Afu y ADN polimerasas termoestables*

- 5
1. MWM VII de Roche
  2. 2,5 U de Taq de ROCHE
  3. 2,5 U de Taq de ROCHE y 50 ng de ExoIII-Afu
  - 10 4. 2,5 U de Taq de ROCHE y 33 ng de ExoIII-Afu
  5. 2,5 U de Taq de ROCHE y 25 ng de ExoIII-Afu
  6. 2,5 U de Taq de ROCHE y 20 ng de ExoIII-Afu
  - 15 7. 1  $\mu$ l de Taq AdvanTaq
  8. 1  $\mu$ l de Taq AdvanTaq y 50 ng de ExoIII-Afu
  9. 1  $\mu$ l de Taq AdvanTaq y 33 ng de ExoIII-Afu
  10. 1  $\mu$ l de Taq AdvanTaq y 25 ng de ExoIII-Afu
  - 20 11. 1  $\mu$ l de Taq AdvanTaq y 20 ng de ExoIII-Afu
  12. 0,5  $\mu$ l Taq Klen<sup>1</sup>
  13. 0,5  $\mu$ l Taq Klen<sup>1</sup> y 50 ng de ExoIII-Afu
  - 25 14. 0,5  $\mu$ l Taq Klen<sup>1</sup> y 33 ng de ExoIII-Afu
  15. 0,5  $\mu$ l Taq Klen<sup>1</sup> y 25 ng de ExoIII-Afu
  16. 0,5  $\mu$ l Taq Klen<sup>1</sup> y 20 ng de ExoIII-Afu
  17. MWM VII de Roche

30

Figura 3

35 *Inducción de PCR con cebadores 3'-ddC-bloqueados, exonucleasa III-Afu y ADN polimerasa Taq*

1. MWM VII de Roche
- 40 2. 2,5 U de Taq de ROCHE
3. 2,5 U de Taq de ROCHE y 100 ng de ExoIII-Afu
4. 2,5 U de Taq de ROCHE y 50 ng de ExoIII-Afu
- 45 5. 2,5 U de Taq de ROCHE y 33 ng de ExoIII-Afu
6. 2,5 U de Taq de ROCHE y 25 ng de ExoIII-Afu
7. 2,5 U de Taq de ROCHE y 20 ng de ExoIII-Afu
8. 2,6 U de enzima ExpandHighFidelity en tampón  
ExpandHiFi
- 50 9. MWM VII de Roche

55

60

65

## ES 2 331 112 T3

Figura 4

### *Inducción de PCR con cebadores bloqueados con 3'-fluoresceína y exonucleasa III*

5 Las amplificaciones en los carriles 3 a 7 se llevaron a cabo utilizando cebadores según las secuencias SEC ID n° 5 (no bloqueado) y n° 6 (bloqueado). Las amplificaciones en los carriles 8 a 12 se llevaron a cabo utilizando cebadores según las secuencias SEC ID n° 7 (no bloqueado) y 8 (bloqueado).

- 10 1. MWM VI de Roche
2. MWM V de Roche
3. 1,6 U de Taq
4. 1,6 U de Taq y 76 ng de ExoIII-Afu
- 15 5. 1,6 U de Taq y 101 ng de ExoIII-Afu
6. 1,6 U de Taq y 152 ng de ExoIII-Afu
7. Control (mezcla para PCR sin ADN y con ExoIII-Afu)
- 20 8. 1,6 U de Taq
9. 1,6 U de Taq y 76 ng de ExoIII-Afu
10. 1,6 U de Taq y 101 ng de ExoIII-Afu
- 25 11. 1,6 U de Taq y 152 ng de ExoIII-Afu
12. Control (mezcla para PCR sin ADN y ExoIII-Afu)
13. MWM V de Roche
14. MWM VI de Roche
- 30

### Ejemplo 1

#### 35 *Síntesis de oligonucleótidos*

Para la síntesis de oligonucleótidos, se utilizaron los reactivos siguientes:

- 40 - éster NHS rojo 640 de LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, n° de cat. 2015161),
- fluoresceína CPG de LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, n° de cat. 3138178),
- CPG 3'-fosfato (Glen Research, n° de cat. 20-2900-xx),
- 45 - espaciador C3 propilo (Glen Research, n° de cat. 10-1913-xx-),
- 2'-OMe-G-fosforamidito (Glen Research, n° de cat. 10-3121-xx),
- 2'-OMe-C-fosforamidito (Glen Research, n° de cat. 10-3110-xx),
- 50 - 2'-OMe-U-fosforamidito (Glen Research, n° de cat. 10-3130-xx),
- 2',3'-dideoxi-C-CPG (Glen Research, n° de cat. 20-2017-xx).

55 Se llevó a cabo la síntesis de oligonucleótidos según protocolos estándares en una máquina de síntesis de ADN (modelo ABI 394-08 de Applied Biosystems). La escala de la síntesis era de 1,0  $\mu$ moles.

60 Los soportes sólidos se obtuvieron de GlenResearch en columnas prerellenas o rellenas en columnas de síntesis vacías (Glen Research, n° de cat. 20-0030-00) y las columnas de adaptaron a la posición sintetizadora correspondiente. Se utilizaron 3'-fosforamiditas estándares ( $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ib_2\text{Gd}$ ,  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bz_6\text{Ad}$ ,  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bz_4\text{Cd}$ ,  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]Td$ ). La síntesis se llevó a cabo según protocolos estándares de síntesis de ADN.

65 Los cebadores y los cebadores 3' bloqueados se sintetizaron en el modo "separación de tritilos". La desprotección se realizó con  $\text{NH}_3$  al 25%/H<sub>2</sub>O durante 8 horas a 55°C. La purificación en MonoQ (columna de 5,0 x 50 mm, Amersham Pharmacia Biotech) se llevó a cabo de la manera siguiente: tampón A: hidróxido sódico 10 mM/agua, B: cloruro sódico 1 M en hidróxido sódico 10 mM/agua, caudal: 1 ml/minuto en 30 minutos, de 0% B a 100% B). La desalación se llevó a cabo mediante diálisis.

## ES 2 331 112 T3

Se sintetizaron sondas LC-Red 640 según las instrucciones insertadas en el paquete, proporcionadas conjuntamente con el NHS éster LightCycler Red 640. Las sondas de fluoresceína se sintetizaron según las instrucciones insertadas en el paquete proporcionadas conjuntamente con la fluoresceína-CPG Light Cycler.

### 5 Ejemplo 2

*Inducción Exo-Start de PCR con cebadores 3'-P-bloqueados, exonucleasa III-Afu y ADN polimerasa Taq*

10 Se llevó a cabo una PCR para amplificar un fragmento de 2.763 pb procedente del gen *p53* humano utilizando cebadores no modificados, según las secuencias SEC ID n° 1 y 2, o cebadores 3'-fosfato-bloqueados, según las secuencias SEC ID n° 1 y 2. La introducción de la modificación del fosfato se consiguió tal como es conocido de la técnica según el Ejemplo 1. Las reacciones de PCR se prepararon con 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1435094) con o sin adición de 38 a 152 ng de exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus* (documento EP n° A-1088891), 200 ng de ADN genómico humano (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1691112), 15 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores anteriormente indicados, 200  $\mu$ M de dNTPs (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1969064),  $MgCl_2$  1,5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,9 (25°C) y  $(NH_4)_2SO_4$  22 mM en un volumen de reacción final de 50  $\mu$ l.

20 Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo bajo condiciones estándares:

**94°C durante 2 min. (1 ciclo)**

25

30 **94°C durante 10 s.**  
**55°C durante 30 s.** } (35 ciclos)  
**72°C durante 4 min.**

35

40

**72°C durante 7 min. (1 ciclo)**

45

45 Como control, se llevó a cabo una PCR con los mismos cebadores indicados anteriormente, aunque no bloqueados. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato Block Cycler 9600 de Perkin Elmer. Tras completar el protocolo de termociclado, las mezclas se detuvieron con 10  $\mu$ l de solución de parada y 25  $\mu$ l de cada mezcla se separaron en un gel de agarosa al 1%.

50 Tal como se muestra en la fig. 1, en ausencia de ExoIII-Afu, no se detecta producto de PCR (carriles 2, 7); en presencia de ExoIII-Afu se obtiene un producto de PCR específico (carriles 3 a 6, 8 a 11). Además, la utilización de cebadores 3' bloqueados según la invención resulta en un incremento sustancial del rendimiento de producto (comparar los carriles 8 a 11 con los carriles 3 a 6) y en una pérdida deseada de cebadores dímeros.

### 55 Ejemplo 3

*Sustitución de la polimerasa Taq por otras polimerasas de tipo I en la PCR con etapa de inducción de ExoIII*

60 Se llevó a cabo PCR con los mismos cebadores bloqueados en el extremo 3' con un grupo fosfato y las concentraciones finales indicadas en el Ejemplo 1. La polimerasa Taq de ROCHE en el presente experimento se comparó con AdvanTaq<sup>TM</sup> (Clontech, n° 8432-1), un mutante por delección N-terminal de polimerasa Taq, y con KlenTaqI<sup>TM</sup> (Ab Peptides, Inc., n° 1001), otro mutante por delección N-terminal de la polimerasa Taq. Los componentes de la mezcla de PCR para Taq de ROCHE eran los indicados en el Ejemplo 1. La reacción con las otras dos polimerasas se preparó con los tampones de reacción entregados especialmente y los volúmenes de enzima recomendados sin y con la adición de 20 a 50 ng de exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus*.

65

## ES 2 331 112 T3

Las ampliaciones por PCR (50  $\mu$ l) se llevaron a cabo bajo condiciones estándares:

5  
10  
15  
20

**94°C durante 2 min. (1 ciclo)**

**94°C durante 10 s. }  
55°C durante 30 s. } (35 ciclos )  
68°C durante 4 min }**

**68°C durante 7 min. (1 ciclo)**

25 Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato Block Cyler 9600 de Perkin Elmer. Tras completar el protocolo de termociclado, las mezclas se detuvieron con 10  $\mu$ l de solución de parada y 25  $\mu$ l de cada mezcla se separaron en un gel de agarosa al 1%.

30 Tal como se muestra en la fig. 2, la utilización de cebadores bloqueados en combinación con exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus* resulta aplicable a todos los tipos de reacción PCR utilizando diferentes tipos de polimerasa Taq.

### Ejemplo 4

35 *Inducción de PCR con cebadores 3'-ddC-bloqueados, exonucleasa III-Afu y ADN polimerasa Taq*

40 Se llevó a cabo una PCR para amplificar un fragmento de 2.767 pb del gen *p53* humano utilizando cebadores según las secuencias SEC ID n° 3 y 4. Los oligonucleótidos de las secuencias SEC ID n° 3 y 4 se bloquearon químicamente mediante la adición de un ddCMP adicional, tal como se indica en la descripción detallada y en el Ejemplo 1.

45 Las reacciones de PCR se prepararon con 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1435094), sin y con adición de 20 a 100 ng de exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus* (documento EP n° A-1088891). La mezcla de reacción contenía además: 100 ng de ADN genómico humano (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1691112), 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores anteriormente indicados, 200  $\mu$ M de cada dNTP (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1969064), MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 (25°C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 17,5 mM, Tween 20 al 2,5% (v/v) y DMSO al 1,5% (v/v).

Las ampliaciones por PCR (50  $\mu$ l) se llevaron a cabo bajo condiciones estándares: por ejemplo,

50  
55  
60

**94°C durante 2 min. (1 ciclo)**

**94°C durante 10 s. }  
62°C durante 30 s. } (35 ciclos )  
68°C durante 4 min }**

**68°C durante 7 min. (1 ciclo)**

65 Asimismo, en el presente experimento se comprobó la capacidad de la polimerasa de alta fidelidad Expand High Fidelity (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1732641), que comprende una ADN polimerasa Taq en combinación con una actividad de nucleasa 3'-5' de la polimerasa de tipo B de *Pyrococcus woessii*, para eliminar los cebadores dCC-bloqueados antes de la reacción de amplificación. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato Block Cyler 9600 de Perkin Elmer. Tras completar el protocolo de termociclado, se añadieron 10  $\mu$ l de solución de parada y se separaron 25  $\mu$ l de cada mezcla en un gel de agarosa al 1%.

## ES 2 331 112 T3

Los resultados mostrados en la fig. 3 demuestran que la polimerasa Taq por sí sola no es capaz de eliminar la base bloqueada de los cebadores e iniciar la elongación (carril 2). De manera similar, la exonucleasa del sistema de alta fidelidad no es capaz de catalizar dicha eliminación (carril 8). Por el contrario, las mezclas equilibradas de polimerasa Taq y nucleasa ExoIII-Afu resultaron en una amplificación (carriles 4 a 7). Puede concluirse que, en el caso de que se utilice una polimerasa termoestable con una actividad adicional de exonucleasa III en lugar de un enzima que únicamente presente actividad de exonucleasa III, resulta necesario utilizar dicho enzima termoestable de manera que la actividad de polimerasa del mismo se pierda o por lo menos se reduzca significativamente.

### 10 Ejemplo 5

#### *PCR con cebadores 3'-bloqueados con fluoresceína y exonucleasa III*

Se llevó a cabo una PCR para amplificar un fragmento del gen *ApoE* humano utilizando cebadores con las secuencias SEC ID nº 5 y 6, en donde el cebador con la secuencia SEC ID nº 6 se marcó en el extremo 3' del mismo con un grupo fluoresceína según protocolos estándares, tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. El tamaño del fragmento para PCR era 96 pb. Alternativamente, se llevó a cabo la amplificación del mismo gen diana con cebadores con las secuencias SEC ID nº 7 y 8, en donde el cebador con la secuencia SEC ID nº 8 se encontraba marcado en el extremo 3' del mismo con un grupo fluoresceína, según los protocolos estándares, tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. El tamaño del fragmento para PCR era 109 pb.

En ambos casos, las reacciones de PCR se prepararon con 2  $\mu$ l de LightCycler-DNA Master SYBR GreenI (ROCHE Molecular Biochemicals, nº 2015099), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, DMSO al 10%, 200 ng de ADN genómico humano (ROCHE Molecular Biochemicals, nº 1691112) sin y con adición de 76 a 152 ng de exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus*. El volumen final de reacción de 20  $\mu$ l se ajustó con agua destilada.

*Las condiciones de la PCR eran las siguientes:*

#### 30 1 Ciclo:

Desnaturalización: 95°C            2 minutos

#### 35 45 ciclos:

Desnaturalización: 95°C            0 s.

40 Hibridación:                    60°C            10 s.

Elongación:                        72°C °        10 s.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, nº 2011468) que se programó siguiendo las instrucciones del fabricante contenidas en el manual para el usuario. Tras completar la reacción de amplificación, se añadieron 5  $\mu$ l de solución de parada a la mezcla para PCR y la mezcla se analizó en un gel de agarosa MS al 3% (ROCHE Molecular Biochemicals, nº 1816586), tal como se muestra en la fig. 4.

Con la pareja de cebadores utilizada no se obtuvo ningún producto de amplificación en ausencia de exonucleasa III (carriles 3, 8), mientras que los productos de amplificación se generaron en presencia de ExoIII-Afu (carriles 4 a 6, 9 a 11), indicando que la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* es capaz de eliminar el grupo fluoresceína del extremo 3' de diferentes cebadores, permitiendo de esta manera que tengan lugar las reacciones de PCR.

### 55 Ejemplo 6

#### *Dependencia de la temperatura de ExoIII-Afu*

En seis ensayos paralelos, se añadieron 2  $\mu$ l de ExoIII-Afu (0,5 mg/ml) a 100  $\mu$ l de mezclas de reacción que contenían 1  $\mu$ g de plásmido pBR322 linearizado con Bam-HI en un tampón Expand HiFi (Roche Molecular Biochemicals). Se incubaron las muestras durante 60 minutos a 20°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, respectivamente. Posteriormente, se añadieron 5  $\mu$ l de solución de parada a la mezcla de incubación y seguidamente la mezcla se analizó en un gel de agarosa al 1%. No pudo observarse degradación en los casos de incubación a 20°C y a 37°C. Se observó degradación parcial del plásmido en los casos de incubación a 50°C y a 60°C. Se observó la degradación completa del plásmido en los casos de incubación a 70°C y a 80°C, indicando que ExoIII-Afu es un enzima termoestable y que presenta un óptimo de temperatura muy superior a 37°C.

## ES 2 331 112 T3

### Ejemplo 7

#### *PCR en tiempo real con ExoIII-Afu utilizando la detección de sonda de hibridación*

5 Para la detección y cuantificación de los amplicones de PCR en la PCR en tiempo real, resulta esencial que las sondas de hibridación bloqueadas y marcadas con color permanezcan intactas durante la PCR, es decir, la exonucleasa III no debería poder cortar los extremo 3' bloqueados/marcados de las sondas. Con este fin, se diseñaron y se sintetizaron las sondas de hibridación con modificaciones adicionales en el extremo 3', según métodos conocidos de la técnica, tal como se da a conocer en el Ejemplo 1.

10 Se utilizaron los cebadores según las secuencias SEC ID n° 9 y 10 para amplificar un fragmento del gen de la  $\beta$ -actina. También se prepararon sondas de hibridación-FRET según el Ejemplo 1. Como sonda aceptora, se preparó un oligonucleótido con la secuencia SEC ID n° 11, marcado en el extremo 5' con LCRed-640, en el que los dos nucleótidos 3' terminales eran 2'-metoxi-nucleósidos. Además, el último residuo 3' terminal portaba un espaciador propilo en el extremo 3'. Como sonda donante, se utilizó un oligonucleótido con la secuencia SEC ID n° 15 12 marcado en el extremo 3' con fluoresceína, en el que los dos residuos 3' terminales eran residuos 2'-metoxi-nucleósidos.

20 Las reacciones de PCR se prepararon con 2  $\mu$ l de sonda de hibridación LightCycler-10x DNA Master (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 20150102), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 0,2  $\mu$ M de cada sonda, 200 ng de ADN genómico humano (ROCHE Molecular Biochemicals, n° 1691112) sin y con la adición de 50 ng de exodesoxirribonucleasa III de *A. fulgidus*. Se ajustó el volumen final de reacción de 20  $\mu$ l con agua destilada. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un aparato LightCycler (Roche Diagnostics, n° 2011468) programado siguiendo las instrucciones del fabricante contenidas en el manual para el usuario.

25 *Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:*

30 1 Ciclo:

Desnaturalización: 95°C            2 minutos

35 45 ciclos:

Desnaturalización: 95°C            0 segundos

40 Hibridación:                        60°C            10 segundos

Elongación:                         72°C            10 segundos

45 Se detectó la identidad del amplicón correcto mediante análisis de la curva de fusión:

50 Desnaturalización: 95°C            30 segundos

Hibridación:                        50°C            15 segundos

55 Calentamiento:                    95°C            0 segundos

Enfriamiento:                      40°C            30 segundos

60 El análisis de los datos demostró la posibilidad de amplificar, detectar y cuantificar el ADN con sondas de hibridación apropiadamente modificadas, en presencia de exonucleasa III.

65

## Lista de referencias

- Bernad, A., et al.,** *Cell* 59 (1989) 219-28
- 5 **Bernard, P. S., et al.,** *Anal Biochem* 255 (1998) 101-7
- Bessman et al.,** *J. Biol. Chem.* 223 (1957) 171-177
- Bult, C. J., et al.,** *Science* 273 (1996) 1058-73
- 10 **Buttin, G. and Kornberg, A.,** *J Biol Chem* 241 (1966) 5419-27
- Chien, A., et al.,** *J Bacteriol* 127 (1976) 1550-7
- 15 **Chou, Q., et al.,** *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 1717-23
- Cline, J., et al.,** *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 3546-51
- Diaz, R. S. and Sabino, E. C.,** *Braz J Med Biol Res* 31 (1998)1239-42
- 20 **Kainz, P., et al.,** *Biotechniques* 28 (2000) 278-82
- Kellogg, D. E., et al.,** *Biotechniques* 16 (1994) 1134-7
- 25 **Klenk, H. P., et al.,** *Nature* 390 (1997) 364-70
- Lawyer, F. C., et al.,** *J Biol Chem* 264 (1989) 6427-37
- Lin, Y. and Jayesena, S. D.,** *J Mol Biol* 271 (1997) 100-11
- 30 **Moretti, T., et al.,** *Biotechniques* 25 (1998) 716-22
- Nilsson, J., et al.,** *Biotechniques* 22 (1997) 744-51
- 35 **Sharkey, D. J., et al.,** *Biotechnology* (N Y) 12 (1994) 506-9
- Siwek, B., et al.,** *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 5031-8
- Slupphaug, G., et al.,** *Anal Biochem* 211 (1993) 164-9
- 40 **Smith, D. R., et al.,** *J Bacteriol* 179 (1997) 7135-55
- Uernori, T., et al.,** *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 259-65
- 45 EP 0 258017
- EP 0 455 430
- EP 0 547 359
- 50 EP 0 547 920
- EP 0 693078
- 55 EP 0 701 000
- EP 0 744470
- EP-A-1088891
- 60 US 4,889,818
- US 5,118,801
- 65 US 5,210,015
- US 5,322,785

## ES 2 331 112 T3

US 5,352,778

US 5,436,149

5 US 5,491,086

US 5,545,552

10 US 5,677,152

US 5,693,502

US 5,792,607

15 US 5,985,619

US 6,174,670

US 6,174,998

20 WO 92/03556

WO 92/09689

25 WO 95/16028

WO 96/10640

WO 96/22389

30 W4 96/41014

WO 97/35988

35 WO 97/46706

WO 98/14590

40

45

50

55

60

65

# ES 2 331 112 T3

## REIVINDICACIONES

1. Composición para realizar una PCR de inicio en caliente, que comprende:

- una ADN polimerasa termoestable
- una exonucleasa 3'-5' termoestable

- por lo menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo 3' terminal modificado que no resulta elongado por dicha ADN polimerasa termoestable.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha Exonucleasa es más activa a temperaturas de entre 37°C y 72°C, y menos activa a temperaturas inferiores a 37°C.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha Exonucleasa termoestable es un homólogo de la Exonucleasa III o una ADN polimerasa mutada con actividad de polimerasa nula o reducida.

4. Composición según las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende un compuesto para la detección de un producto de amplificación.

5. Composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que por lo menos un cebador se modifica en el extremo 3' con un grupo fosfato o con un grupo químico que se encuentra unido al desoxinucleótido 3' terminal mediante un grupo fosfato.

6. Composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que por lo menos un cebador presenta un residuo dideoxi-nucleótido 3' terminal.

7. Kit que comprende una composición según las reivindicaciones 1 a 3.

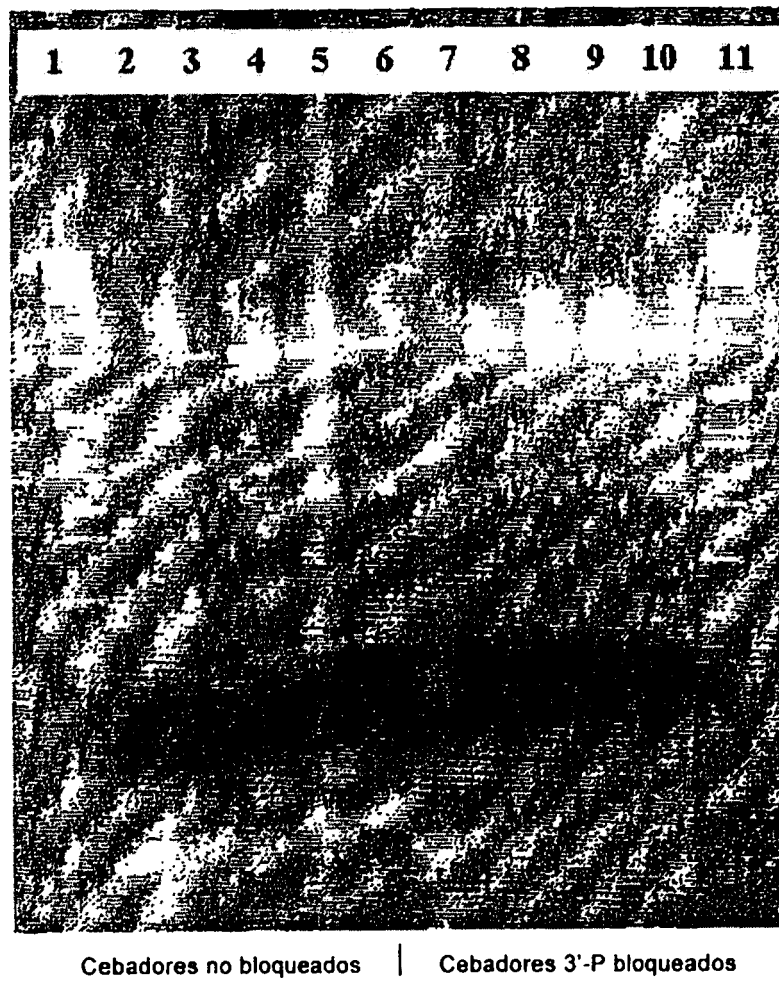
8. Método para realizar una PCR de inicio en caliente de un ácido nucleico molde, que comprende:

a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende por lo menos un cebador que se encuentra modificado en el residuo 3' terminal del mismo de manera que dicho cebador no resulta elongado por una ADN polimerasa termoestable, y una exonucleasa termoestable,

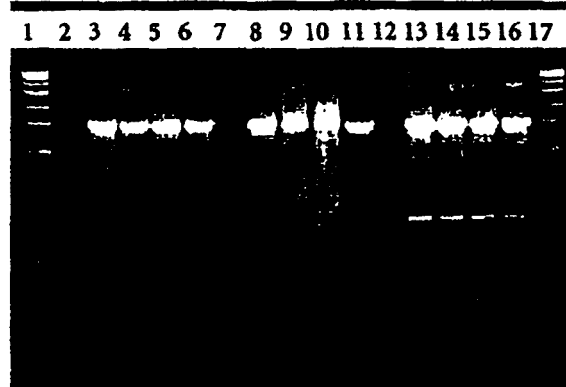
b) eliminar dicha modificación sin la adición de componentes adicionales de la mezcla de reacción mediante la elevación de la temperatura de dicha mezcla de reacción,

c) amplificar el ácido nucleico de molde, en la que el residuo 3' terminal de por lo menos un cebador resulta eliminado por dicha exonucleasa termoestable.

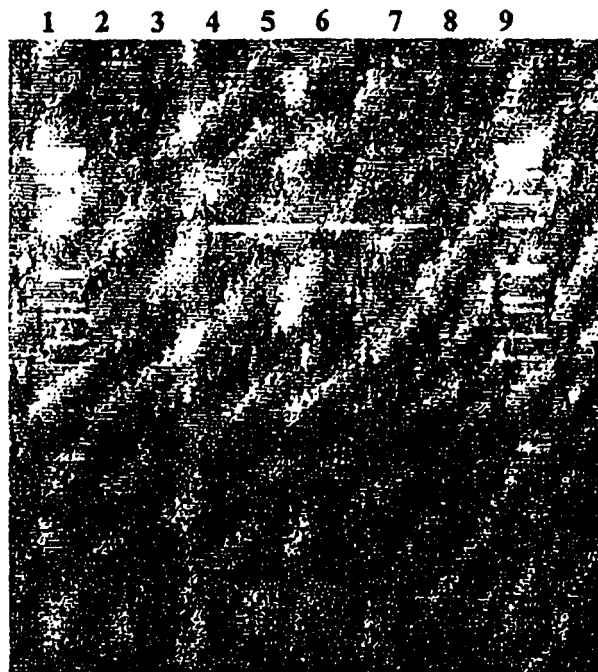
**Fig.1**



**Fig. 2**

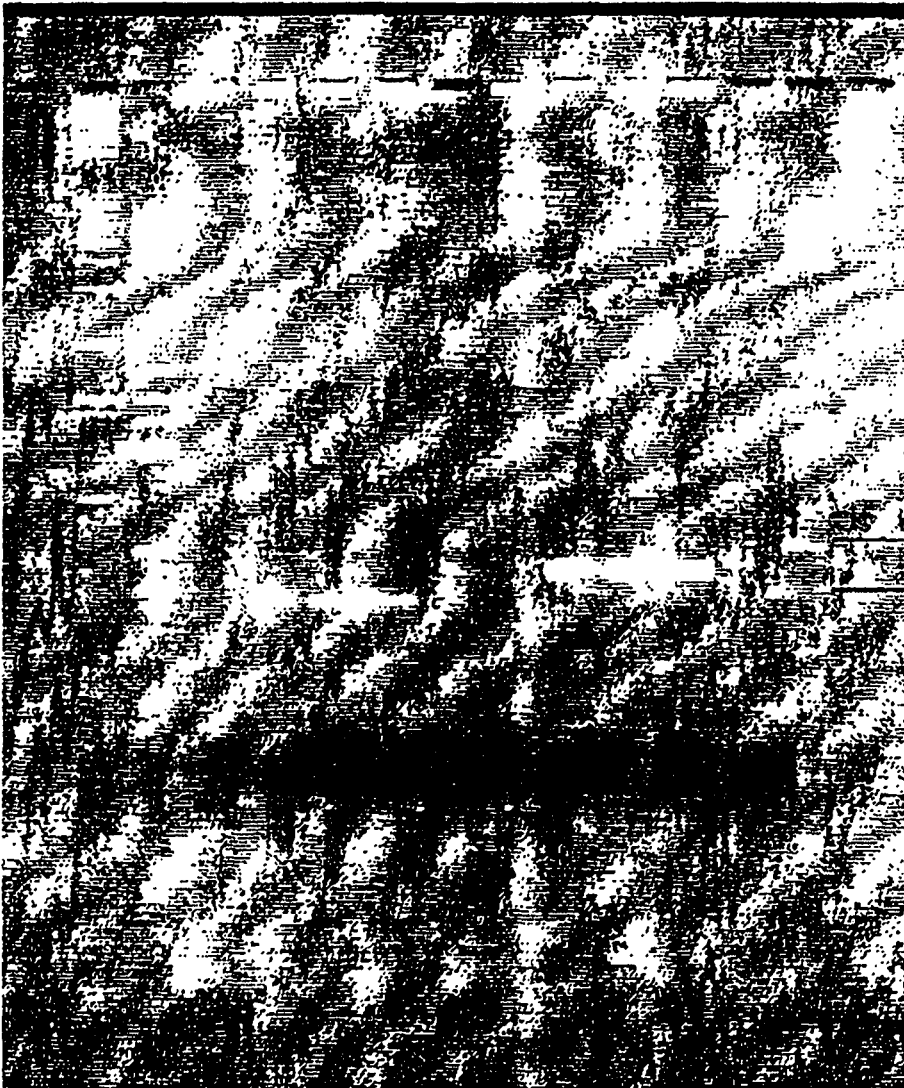


**Fig. 3**



**Fig. 4**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



124/123 pb  
104 pb  
89/80 pb



## ES 2 331 112 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 4

<400> 4

5           tgttagactg gaaactttcc a           21

<210> 5

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 5

<400> 5

20           acggctgtcc aaggagctgc           20

<210> 6

<211> 25

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 6

<400> 6

          tgcacctcgc cgcggtactg cacca       25

35 <210> 7

<211> 19

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 7

45 <400> 7

          ctcgcggatg gcgctgagg           19

50 <210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 8

60 <400> 8

          gctgcgtaag cggctcctcc gcgatgccg       29

<210> 9

65 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 331 112 T3

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 9

5 <400> 9  
caccccgtgc tgctgaccga 20

10 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 10

20 <400> 10  
agggaggcgg ccaccagaag 20

25 <210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 11

35 <400> 11  
gccttggggt tcaggggggc 20

40 <210> 12  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de molécula combinada ADN/ARN:derivado desoxiuridina

50 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 12

55 <400> 12  
cctgggtcat cttctcgagg uu 22

60

65



## ES 2 331 112 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 4

<400> 4

5           tgtagactg gaaactttcc a                   21

<210> 5

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 5

<400> 5

20           acggctgtcc aaggagctgc                   20

<210> 6

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 6

30 <400> 6

          tgcacctgc cgcggtactg cacca           25

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 7

45 <400> 7

          ctcgcggatg gcgctgagg                   19

<210> 8

50 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 8

<400> 8

60           gctgcgtaag cggctcctcc gcgatgccg           29

<210> 9

<211> 20

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

