



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 987**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07823852 .4**
96 Fecha de presentación : **26.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2081948**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

54 Título: **Nuevo oligonucleótido marcado.**

30 Prioridad: **28.09.2006 FR 06 53982**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2011

73 Titular/es: **BIOMÉRIEUX S.A.**
chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR

72 Inventor/es: **Bernal-Mendez, Eloy;**
Laayoun, Ali y
Laurent, Alain

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

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo oligonucleótido marcado.

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo oligonucleótido marcado. La invención también se refiere a un procedimiento que emplea dicho oligonucleótido.

A menudo es necesario, en las tecnologías relativas a los ácidos nucleicos y al material genético, determinar si un gen, una parte de un gen o una secuencia nucleotídica está presente en un organismo vivo, un extracto celular de este organismo o cualquier otra muestra biológica.

- 10 En la bibliografía se describen diferentes tipos de métodos de detección de ácidos nucleicos. Estos métodos, y particularmente aquellos que requieren la detección de polinucleótidos, se basan en las propiedades de emparejamiento de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos, denominado habitualmente "hibridación de ácidos nucleicos" o simplemente "hibridación".

- 15 De manera general, después de identificar la secuencia específica de un organismo o de una enfermedad que debe ser analizada, es conveniente extraer los ácidos nucleicos de una muestra, amplificar y detectar la secuencia de interés. Numerosos métodos de amplificación y de detección se han desarrollado con este fin.

- De este modo, la PCR (*Polymerase Chain Reaction* [reacción en cadena de la polimerasa]) se basa en la repetición de un proceso en tres etapas: desnaturalización del ADN de cadena doble, la hibridación de los cebadores con el ADN de cadena sencilla, y la extensión enzimática de los cebadores por una ADN polimerasa termoestable que sintetiza una cadena de ADN complementario al que sirve de diana para los cebadores oligonucleotídicos.
- 20

- La amplificación puede analizarse al final del ciclo (PCR "*end point*") o en tiempo real (PCR en tiempo real) gracias a la utilización de un marcado fluorescente del producto amplificado. Existen varias técnicas de PCR en tiempo real. Una de ellas emplea sondas particulares denominadas "*molecular beacons*", que son secuencias en horquilla (o "*hairpin*") que comprenden una estructura en bucle "*loop*", una varilla "*stem*" que contiene un fluoróforo en un extremo de la secuencia y un extintor de fluorescencia (o "*quencher*") en el otro extremo (Tyagi, S. y Kramer, FD., Nat. Biotechnol., 1996, 14, 303-308, Marras, SA. et al, Genet Anal., 1999, 14, 151-156). Por debajo de la temperatura de hibridación, estas secuencias, no hibridadas con una secuencia diana, adoptan una configuración llamada en "horquilla": los extremos 5' y 3' están próximos, no hay emisión de fluorescencia. Cuando la sonda mediante la secuencia del bucle (*loop*) reconoce a, e hibrida con, un amplicón, que corresponde a la secuencia diana amplificada, la estructura de la varilla (*stem*) se desestabiliza, los extremos se alejan, el "*quencher*" ya no desempeña su papel y se produce emisión de fluorescencia.
- 25
- 30

- Los documentos US-A5.866.336 y US-A-6.117.635, de los mismos inventores, proponen también sondas llamadas "*molecular beacons*", también llamadas balizas moleculares, pero en una configuración particular. De este modo, el extremo 3' de la sonda se prolonga en forma de un cebador de amplificación. Este último, una vez hibridado con su diana complementaria, permite por elongación, y eventualmente con ayuda de un cebador de amplificación adaptado, la amplificación de la diana.
- 35

- Sin embargo, esta configuración obliga a los científicos a encontrar no solamente dos zonas adyacentes para definir el cebador de amplificación (seleccionado en general por su sensibilidad) y la sonda de detección (seleccionada en general por su especificidad). Siendo ya difícil la definición de dichas zonas incluso en ausencia de tensión por proximidad, el desafío es, en este caso, muy arduo incluso en algunos casos imposible.
- 40

- Sin embargo, en algunas condiciones, la emisión de fluorescencia por sondas "*molecular beacons*" puede ser "parasitada" por un ruido de fondo debido al alejamiento del fluoróforo y del "*quencher*" consecuencia de una degradación por nucleasas presentes durante la reacción de amplificación. Éste es particularmente el caso durante una PCR "convencional", ya que la propia enzima Taq polimerasa posee una actividad 5' nucleasa. Además, aparte de la emisión de fluorescencia "parásita" que aparece durante una PCR en tiempo real, la escisión de las "*molecular beacons*" debido a la presencia de enzima termoestable polimerasa al final del ciclo afecta a un análisis de gradiente de temperatura posterior ("*end point*") a la amplificación. Ahora bien, este análisis de gradiente de temperatura posterior a la amplificación es el método más sensible para detectar variaciones simples de las secuencias, como los SNP ("*single nucleotide polymorphisme*", o polimorfismo de un solo nucleótido) mediante las "*molecular beacons*".
- 45

- La NASBA es otra tecnología de amplificación, isotérmica, de ácido nucleico que se basa en la acción conjunta de tres enzimas (transcriptasa inversa AMV, ARNasa-H y ARN T7 polimerasa). La amplificación puede analizarse al final del ciclo (NASBA "*end point*") o en tiempo real (NASBA en tiempo real) gracias a la utilización de un marcado fluorescente del producto amplificado, mediante la utilización de sondas "*molecular beacons*". Sin embargo, en "*end point*", la presencia de ARNasa H, enzima indispensable durante el inicio de la NASBA, puede inducir, al final de la reacción, una degradación del ARN diana híbrido con la "*molecular beacon*". Se observa entonces una disminución
- 50
- 55

de la señal de fluorescencia que se debe a la escisión del ARN diana. Un análisis de gradiente de temperatura posterior a la amplificación es, por lo tanto, delicado.

Ya sea en PCR o en NASBA, la emisión de fluorescencia también puede ser parasitada por la hibridación no específica de la parte de la varilla de la "molecular beacon" con el amplicón. Es importante entonces reducir esta hibridación parásita.

Finalmente, las "molecular beacons" también pueden utilizarse para la detección de secuencias diana independientemente de una amplificación. En efecto, es posible analizar la expresión de un gen en células vivas mediante la inyección de "molecular beacons", reflejando la fluorescencia emitida la hibridación de la sonda con un transcrito diana. Sin embargo, la presencia de numerosas nucleasas activas en la célula implica una fuerte degradación de las sondas, y por lo tanto induce la emisión de fluorescencia que no se debe a la hibridación de la sonda con una secuencia diana.

Es importante, por lo tanto, mejorar las técnicas de amplificación actuales para hacerlas más sensibles, disminuyendo particularmente los fenómenos de escisión no específicos de las "molecular beacons" del estado de la técnica.

La presente invención se propone resolver el conjunto de los inconvenientes del estado de la técnica presentando nuevos oligonucleótidos marcados específicos, estables y resistentes a las nucleasas.

En este sentido, la invención se refiere a un oligonucleótido marcado que comprende un primer segmento nucleotídico, un segundo segmento nucleotídico, complementario de una secuencia diana, y un tercer segmento nucleotídico, complementario de dicho primer segmento nucleotídico, caracterizado porque comprende un fluoróforo, un extintor y al menos un nucleósido de anomería alfa.

Preferentemente, dichos primer y tercer segmentos están a uno y otro lado del segundo segmento.

Preferentemente, dicho segundo segmento está constituido por nucleótidos de anomería alfa.

Preferentemente, el oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención se caracteriza porque el fluoróforo está en un extremo de dicho oligonucleótido y el extintor está en el otro extremo de dicho oligonucleótido.

Preferentemente, dicho fluoróforo es una fluoresceína. Preferentemente, dicho extintor es dabsilo.

Preferentemente, dicho primer segmento comprende de 3 a 8 nucleótidos, dicho segundo segmento comprende de 10 a 35 nucleótidos, y dicho tercer segmento, cuando está presente, comprende de 3 a 8 nucleótidos.

La invención también se refiere a un procedimiento para detectar un material nucleico en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

- a) se extrae el material nucleico de una muestra biológica,
- b) se amplifica el material nucleico para obtener amplicones de al menos una secuencia diana del material nucleico
- c) se utiliza, simultáneamente a la etapa b) o posteriormente a la etapa b), al menos un oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención
- d) se detecta la presencia de dichos amplicones

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se amplifica el material nucleico mediante PCR.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se amplifica el material nucleico mediante PCR.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, se amplifica el material nucleico mediante NASBA.

Las siguientes definiciones permitirán comprender mejor la invención.

En el sentido de la presente invención, se entiende por "cadena arriba", una región situada en el lado del extremo 5' del ácido nucleico o de la secuencia polinucleotídica, y por "cadena abajo" una región situada en el lado del extremo 3' de dicho ácido nucleico o de dicha región polinucleotídica.

Las expresiones fragmento nucleotídico, fragmentos de ácido nucleico, segmento nucleotídico, segmento de ácido nucleico, secuencia nucleotídica, secuencia de ácido nucleico u oligonucleótido, designan un fragmento de ADN o de ARN natural, un polinucleótido natural o de síntesis, un fragmento de ADN o de ARN de síntesis no modificado o que comprende al menos una base modificada, tales como inosina, metil-5-desoxicitidina, dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino 2,6 purina, bromo 5 desoxiuridina, pseudouridina, pseudoisocitidina, o cualquier otra base modificada que permite la hibridación. Cada una de las modificaciones puede realizarse en

combinación.

Por oligonucleótido marcado, o sonda, se entiende una sucesión de nucleósidos, que comprende además al menos una molécula que permite la detección de dicho oligonucleótido.

5 Este oligonucleótido puede ser, particularmente, una sonda de detección que actúa mediante reconocimiento molecular. Por sonda de detección que actúa por reconocimiento molecular, se entiende una secuencia nucleica de 10 a 100 motivos nucleotídicos, particularmente de 15 a 45 motivos nucleotídicos, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con una secuencia nucleica diana y que emite una señal durante la hibridación de la sonda con la secuencia nucleica diana.

10 La sonda de detección puede ser particularmente una sonda de detección "*molecular beacon*" tal como la descrita por Tyagi & Kramer (Nature Biotech, 1996, 14: 303-308). Estas "*molecular beacons*" se vuelven fluorescentes durante la hibridación. Éstas poseen una estructura de tipo varilla-bucle y contienen un fluoróforo y un grupo "*quencher*". La fijación de la secuencia de bucle específica con su secuencia complementaria de ácido nucleico diana provoca un desenrollado de la varilla y la emisión de una señal fluorescente durante la excitación a la longitud de onda adecuada.

15 La sonda de detección puede ser particularmente una sonda integrada en cebadores o "*primers*" de tipo "Scorpion®" (Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 19 3752-3761) o "Amplifluor®" (Genome Research Vol 1 163-169, 2001 Myakishev M. et al).

20 Los Amplifluor® son secuencias nucleotídicas que poseen en el lado 5' una secuencia con una estructura de varilla-bucle, con un fluoróforo en el extremo 5', y un "*quencher*" de tipo Dabsilo en el otro extremo de la estructura. En el lado 3', los Amplifluor® poseen una secuencia que es complementaria de una secuencia de la diana y que actúa como cebador durante la reacción de amplificación.

25 Los Scorpions® son secuencias que poseen en el lado 5' una secuencia con una estructura de varilla-bucle con un "*quencher*" en un extremo de dicha estructura y un fluoróforo en el otro extremo de dicha estructura. En el lado 3', los Scorpions® poseen una secuencia que es complementaria de una secuencia de la diana y que actúa como cebador durante la reacción de amplificación. En el modo convencional de los Scorpions, un "espaciador", situado entre la secuencia cebador y la secuencia de varilla-bucle permite impedir el reconocimiento de la secuencia de varilla-bucle por la polimerasa. Este espaciador se vuelve opcional si los Scorpions se realizan de acuerdo con la invención.

30 En el sentido de la presente invención, se entiende por "fluoróforo" una molécula que emite una señal de fluorescencia entre 500 y 700 nm cuando es excitada por luz a una longitud de onda adecuada (o entre 450 y 650 nm). El fluoróforo puede ser particularmente una rodamina o derivado tal como Rojo Texas, una fluoresceína o un derivado. En el sentido de la presente invención, se entiende por "fluoresceína" una molécula química aromática que emite una señal de fluorescencia con un máximo de emisión alrededor de 530 nm, cuando es excitada por luz a una longitud de onda alrededor de 495 nm.

35 En el sentido de la presente invención, se entiende por "extintor" (o "*quencher*") una molécula que interfiere en la fluorescencia emitida por un fluoróforo. Este extintor se selecciona particularmente entre moléculas aromáticas no fluorescentes, para evitar emisiones parásitas. Preferentemente, dicho "extintor" es un Dabsilo o un Dabcilo o un "Black hole quencher™". El Dabcilo, el Dabsilo y los "Black hole quencher™" son moléculas aromáticas no fluorescentes que impiden la emisión de fluorescencia cuando se encuentran físicamente en las proximidades de un fluoróforo, o mediante FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia).

40 Por "nucleósido de anomería alfa" o alfa nucleósidos, o nucleósidos alfa, se entiende desoxinucleósidos de configuración anomérica no natural alfa, en el que la base nitrogenada portada por el carbono anomérico de la desoxirribosa está situada por debajo del plano en lugar de estar por encima del plano como en el caso de los nucleósidos beta. Preferentemente, los nucleótidos alfa son aquellos descritos en la solicitud WO 88/04301 y WO-A-90/15813, de los mismos inventores. Es esos documentos se establece que los oligonucleótidos α manifiestan una resistencia muy elevada a las enzimas con respecto a los oligonucleótidos β o naturales.

45 Sin embargo, esos dos documentos solamente proponen oligonucleótidos de los cuales todos los nucleótidos están constituidos por nucleótidos α , para los cuales no es imposible extrapolar una resistencia de oligonucleótidos α hacia un oligonucleótido que puede tener solamente un nucleótido α .

50 Por un lado, la estructura en horquilla es una estructura compleja o también llamada "baliza molecular" en la que existe un equilibrio entre la forma cerrada (forma de horquilla, ausencia de la diana y sin detección) y la forma abierta (hibridada a la diana y detección).

Para que esto se realice, es preciso que se reúnan condiciones de auto-hibridación y de hibridación (particularmente, Tm).

Éstas son bien conocidas para oligonucleótidos convencionales pero no para las balizas moleculares, sobre todo si

éstas incorporan nucleótidos de anomería α . Debido a esto, la realización de una baliza molecular que tiene uno o más nucleótidos de anomería α no es absolutamente evidente para el experto en la materia.

5 Por “extremo”, se entiende el punto de partida y el punto de finalización de la síntesis de un oligonucleótido definidos generalmente por el número portado por los hidroxilos libres portados por el primer o el último nucleósido es decir 3' o 5'. Se entiende que, para una elección apropiada de las unidades de elongación (las fosforamiditas de los nucleósidos alfa o beta), puede sintetizarse un oligonucleótido en sentido 3' a 5' o a la inversa e incluso alternar durante la síntesis el sentido de la elongación. Esto conduce a oligonucleótidos que portan extremos 3'-5, 5'-3' o 3'-3', 5'-5'.

10 Por “primer segmento”, se entiende una secuencia nucleotídica que puede ser complementaria y de polaridad adaptada a dicho tercer segmento cuando éste último está presente.

Por “segundo segmento”, se entiende una secuencia nucleotídica complementaria y de polaridad adaptada a la secuencia de la diana.

Por “tercer segmento”, se entiende una secuencia nucleotídica complementaria y de polaridad adaptada a dicho primer segmento.

15 También se habla de partes de “varilla” para dichos primer y tercer segmentos, y de parte de “bucle” para dicho segundo segmento. Esta realización particular permite obtener un oligonucleótido marcado de tipo “*molecular beacons*”.

20 Por secuencia o región capaz de hibridar con otra secuencia/región, o secuencia complementaria, se entiende una secuencia o una región que puede hibridar con otra secuencia/región en condiciones de hibridación, que pueden determinarse en cada caso de forma conocida. Se habla también de secuencias/regiones complementarias. Una secuencia o región estrictamente complementaria de otra es una secuencia en la que cada una de las bases puede emparejarse con una base de la otra secuencia, sin emparejamiento erróneo. Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en las condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos, que tienen secuencias suficientemente complementarias son susceptibles de formar una cadena doble con puentes de hidrógeno estables y específicos.

25 Las condiciones de hibridación son determinadas por la rigurosidad, es decir el rigor de las condiciones operatorias. La hibridación es tanto más específica en cuanto se realiza a mayor rigurosidad. La rigurosidad se define particularmente en función de la composición de bases de una cadena doble sonda/diana, así como mediante el grado de emparejamiento erróneo entre dos ácidos nucleicos. La rigurosidad también puede estar en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturizantes y/o la temperatura de hibridación.

30 La rigurosidad de las condiciones en las que debe realizarse una reacción de hibridación dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia.

35 Por “polaridad”, se entiende la orientación de la secuencia nucleotídica, de 5' a 3' o de 3' a 5', con respecto a su secuencia complementaria. De este modo, los segmentos pueden estar orientados de forma:

☐ antiparalela: éste es el caso de un oligonucleótido de configuración natural β y de su diana de configuración natural β ? o éste es el caso de un oligonucleótido de configuración no natural α y de su diana de configuración no natural α ?

40 ☐ paralela: éste es el caso de un oligonucleótido de configuración no natural α y de su diana de configuración natural β ? En función de estas reglas de polaridad, pueden obtenerse oligonucleótidos 5'-3', 3'-3' o 5'-5' que son sintetizados por el experto en la materia a partir de moléculas adaptadas.

45 Por “enzima polimerasa”, se entiende una enzima capaz de sintetizar un fragmento de ADN o de ARN complementario a partir de una matriz de ácido nucleico y de un oligonucleótido iniciador (o *primer*). Las enzimas polimerasa tienen a veces una actividad nucleasa que conduce a la degradación de los fragmentos de ácidos nucleicos que hibridan con la diana que está siendo copiada: bloquear esta actividad es entonces muy pertinente en un enfoque en tiempo real, ya que la señal registrada se debe únicamente al reconocimiento molecular y no a una degradación enzimática.

50 En el sentido de la presente invención, se entiende por “material nucleico”, una secuencia de ácidos nucleicos tal como una secuencia de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o de ácidos ribonucleicos (ARN). De acuerdo con una realización preferida de la invención, el material nucleico comprende una secuencia de ácidos desoxirribonucleicos. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el material nucleico se extrae de una muestra biológica extraída de un paciente.

55 En el sentido de la presente invención, se entiende por “muestra biológica”, cualquier muestra susceptible de contener un material nucleico tal como se define a continuación. Esta muestra biológica puede haberse extraído de un paciente y puede ser particularmente una muestra de tejidos, de sangre, de suero, de saliva, de células

circulantes del paciente. Esta muestra también puede ser una muestra: alimentaria. Se dispone de esta muestra biológica mediante cualquier tipo de extracción conocido por el experto en la materia.

En el sentido de la presente invención, se entiende por "secuencia diana", una secuencia nucleotídica de la que al menos una parte de la sucesión de motivos nucleotídicos es específica y complementaria de la secuencia nucleotídica de la sonda de detección utilizada.

En el sentido de la presente invención, durante la etapa a) se extrae el material nucleico de una muestra biológica mediante cualquier protocolo conocido por el experto en la materia. A título indicativo, la extracción de ácidos nucleicos puede realizarse mediante una etapa de lisis de las células presentes en la muestra biológica, para liberar los ácidos nucleicos contenidos en las envueltas proteicas y/o lipídicas de las células (como restos celulares que perturban las posteriores reacciones). Como ejemplo, pueden utilizarse los métodos de lisis tales como los descritos en las solicitudes de patente WO 00/05338 sobre lisis mixta magnética y mecánica, WO 99/53304 sobre lisis eléctrica, y WO 99/15321 sobre lisis mecánica.

El experto en la materia podrá utilizar otros métodos de lisis bien conocidos, tales como choques térmicos u osmóticos o lisis químicas, mediante agentes caotrópicos tales como sales de guanidio (US 5.234.809). Esta etapa de lisis también puede venir seguida de una etapa de purificación, que permite la separación entre los ácidos nucleicos y los otros constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis. Esta etapa permite generalmente concentrar los ácidos nucleicos, y puede adaptarse para la purificación de ADN o de ARN. Como ejemplo, pueden utilizarse partículas magnéticas eventualmente revestidas de oligonucleótidos, mediante adsorción o covalencia (véase a este respecto las patentes US 4.672.040 y US 5.750.338), y purificar de este modo los ácidos nucleicos que están fijados a estas partículas magnéticas, mediante una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de los ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar posteriormente dichos ácidos nucleicos. Una realización particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente WO 97/45202 y WO 99/35500. Otro ejemplo interesante de método de purificación de los ácidos nucleicos es la utilización de sílice en forma de columna, o en forma de partículas inertes (Boom R. et al, J. Clin. Microbiol., 1990, nº 28(3), p. 495-503) o magnéticas (Merck: MagPrep® Sílice, Promega: MagneSil™ Partículas Paramagnéticas). Otros métodos muy extendidos se basan en resinas de intercambio iónico en columna o en formato de partículas paramagnéticas (Whatman: DEAE-Agarosa) (Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Otro método muy pertinente pero no exclusivo para la invención es el de la adsorción sobre soporte de óxido metálico (compañía Xtrana: matriz Xtra-Bind™).

Cuando se desea extraer específicamente el ADN de una muestra biológica, puede realizarse particularmente una extracción con fenol, cloroformo y alcohol para eliminar las proteínas y precipitar el ADN con alcohol al 70%. El ADN puede sedimentarse a continuación mediante centrifugado, lavarse y resuspenderse.

En el sentido de la presente invención, la "etapa b)" es proceso que genera múltiples copias (o amplicones) de una secuencia nucleica mediante la acción de al menos una enzima polimerasa. En el sentido de la presente invención, se entiende por amplicones las copias de la secuencia diana obtenidas durante una reacción de amplificación enzimática.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se amplifica el material nucleico mediante PCR y la etapa b) es una sucesión de ciclos que comprende las siguientes etapas:

o la desnaturalización de la secuencia diana para obtener dos cadenas diana de ADN complementarias, o desestructurar la cadena diana de ARN,

o la hibridación de cada una de las cadenas diana, obtenidas durante la etapa de desnaturalización anterior, con al menos un cebador de amplificación,

o la formación, a partir de los cebadores de amplificación, de cadenas complementarias a las cadenas con las que hibridan en presencia de una enzima polimerasa y de nucleósidos trifosfato

repitiéndose este ciclo un número de veces determinado para obtener la secuencia diana a una concentración suficiente para permitir su detección.

De acuerdo con esta realización, las etapas b) y c) se realizan al mismo tiempo o una después de la otra.

Cuando las etapas b) y c) se realizan al mismo tiempo, esta realización se realiza preferentemente mediante "PCR en tiempo real" que agrupa en una única etapa la técnica de amplificación por PCR y la detección, y que recurre particularmente a "*molecular beacons*". La reacción de PCR tiene lugar en el tubo, produciendo amplicones con los que pueden hibridar las "*molecular beacons*" específicas para dar una señal fluorescente. La formación de las nuevas moléculas de ADN se mide en tiempo real mediante el control de la señal en un lector de fluorescencia, durante de hibridación. La utilización de oligonucleótidos marcados de acuerdo con la presente invención permite evitar que las sondas de detección sean degradadas por la enzima de amplificación (por ejemplo la Taq polimerasa), lo que aumenta la sensibilidad de la detección y mejora el rendimiento de la técnica. Cuando las etapas b) y c) se realizan una después de la otra, la reacción de PCR tiene lugar en el tubo, produciendo amplicones. Al final de esta

etapa de amplificación, las "molecular beacons" se añaden al medio de reacción, y pueden hibridar para dar una señal fluorescente. La utilización de oligonucleótidos marcados de acuerdo con la presente invención permite evitar que las sondas de detección sean degradadas por la enzima polimerasa termoestable de amplificación, que queda de manera residual en el tubo de reacción, lo que aumenta la sensibilidad de la detección y mejora el rendimiento de la técnica.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, durante la etapa b), se amplifica el material nucleico mediante NASBA.

De acuerdo con esta realización, las etapas b) y c) se realizan preferentemente una después de la otra. Al finalizar la etapa de amplificación, las "molecular beacons" se añaden al medio de reacción, y pueden hibridar para dar una señal fluorescente. La utilización de oligonucleótidos marcados de acuerdo con la presente invención permite evitar que las sondas de detección sean degradadas por la enzima ARNasa H, que queda de manera residual en el tubo de reacción, lo que aumenta la sensibilidad de la detección y mejora el rendimiento de la técnica.

La "etapa d)" se realiza mediante la detección de la señal de fluorescencia emitida durante la hibridación del oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención con el amplicón, y puede realizarse mediante cualquiera de los protocolos conocidos por el experto en la materia.

Las figuras adjuntas se dan como ejemplo explicativo y no tienen ningún carácter limitante. Éstas permitirán comprender mejor la invención.

La figura 1 presenta un ejemplo de oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención que comprende un primer segmento y un tercer segmento (varilla) sintetizados con nucleósidos alfa (en gris) y un segundo segmento (bucle) sintetizado con nucleósidos beta tal como se describe en el ejemplo 1A.

La figura 2 presenta un ejemplo de oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención que comprende un primer segmento y un tercer segmento (varilla) sintetizados con nucleósidos beta y un segundo segmento (bucle) sintetizado con nucleósidos alfa (en gris) tal como se describe en el ejemplo 1B.

La figura 3 presenta un ejemplo de oligonucleótido marcado de acuerdo con la invención que comprende un primer segmento y un tercer segmento (varilla), así como un segundo segmento (bucle) sintetizados con nucleósidos alfa (en gris) tal como se describe en el ejemplo 1C.

La figura 4 presenta los perfiles de fluorescencia normalizados medidos a 40°C de las *molecular beacons* modificadas o no, tal como se describe en el ejemplo 2A.

La figura 5 presenta los perfiles de fluorescencia normalizados medidos a 95°C para las *molecular beacons* "Oligonucleótido A" y "MB" durante la amplificación en Lightcycler, tal como se describe en el ejemplo 2A.

La figura 6 presenta los perfiles de fluorescencia normalizados medidos a 95°C para las *molecular beacons* "Oligonucleótido B" y "MB" durante la amplificación en Lightcycler, tal como se describe en el ejemplo 2A.

La figura 7 presenta los perfiles de fluorescencia normalizados medidos a 95°C para las *molecular beacons* "Oligonucleótido C" y "MB" durante la amplificación en Lightcycler, tal como se describe en el ejemplo 2A.

La figura 8 presenta los perfiles de desnaturalización térmica con medición de la fluorescencia para las sondas estudiadas con las diferentes secuencias complementarias con o sin *mismatches* (emparejamientos erróneos), tal como se describe en el ejemplo 3.

La figura 9 presenta los perfiles de desnaturalización térmica con medición de la fluorescencia para las sondas estudiadas con las dianas complementarias o no de una parte de la varilla, tal como se describe en el ejemplo 4.

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

Ejemplo 1: Procedimiento de síntesis de oligonucleótidos de acuerdo con la invención

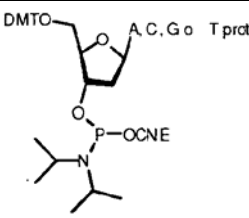
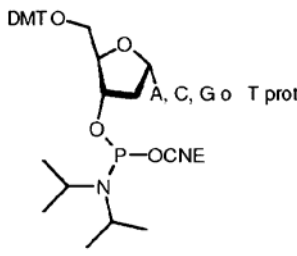
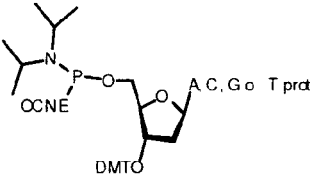
Materias primas: los nucleótidos naturales que se han modificado en 3' con un grupo fosforamidita se denominan 3'amiditas-beta. Estos oligonucleótidos están disponibles en el mercado y se adquieren de Glen Research (Foster City, Estados Unidos).

Los nucleótidos naturales que se han modificado en 5' con un grupo fosforamidita se denominan 5'amiditas-beta, también están disponibles en el mercado y se adquieren de Glen Research (Foster City, Estados Unidos).

Los nucleótidos de anomería alfa modificados en 3' con un grupo fosforamidita se denominan 3'amiditas-alfa, están disponibles en el mercado y se adquieren de Chemgenes (Wilmington, Estados Unidos).

El CPG dabsilo (*Controlled pore glass* [vidrio de poros controlados], CPG) y la fosforamidita de la 6-Fluoresceína son comercializados por Glen Research (Foster City, Estados Unidos).

TABLA 1

Moléculas	Nombre	Ref.
	3'amiditas-beta	Glen Research ref A O G y T: 10-1 000-C2 10-101 0-C2 10-1020-02; 101030C2
	3'amiditas-alfa	Chemgenes (A, C, G y T): ANP 1651; ANP 1652; ANP 1653; ANP 1654.
	5'amiditas-beta	Ref Glen (A, C, G y T): 10-0001-02; 10-0101-02; 10-0201-02; 10-0301-02)

- 5 **Síntesis de los oligonucleótidos:** para la síntesis de los oligonucleótidos se utilizaron 3'amiditas-beta, 5'amiditas-beta, 3'amiditas-alfa, ya que su reactividad es muy similar. Preferentemente, se utilizó un CPG dabsilo y la fosforamidita de la 6-Fluoresceína. El método de síntesis con fosforamiditas fue descrito por Beaucage y Lyer, (Tetrahedron, 48, 223-2311, 1992)

10 De manera general, el primer nucleósido de la secuencia a sintetizar está fijado al soporte sólido (CPG) en posición 3' (o en 5'), estando el extremo 5'OH (o 3') del nucleósido protegido por un grupo dimetoxitritilo ácido lábil (DMT).

- En una primera etapa de destrilación, un tratamiento ácido (ácido tri o dicloroacético) permitía retirar el grupo DMT para generar un extremo OH reactivo.
- En una segunda etapa de "coupling" (acoplamiento), la fosforamidita de la base a añadir se condensa (en 5' o en 3') en este primer sitio de elongación para generar un enlace fosfito triéster. Realizándose la condensación en presencia de un catalizador (tetrazol o S-tio etil tetrazol, o DCI, o...)
- En una tercera etapa de "capping" (modificación en el extremo) los grupos -OH que no hayan reaccionado durante la etapa de condensación anterior son bloqueados mediante un reactivo acilante (anhídrido acético) para evitar deleciones en la secuencia.
- En una cuarta etapa de oxidación, en enlace fosfito triéster se oxidó a enlace fosfato triéster mediante un tratamiento oxidante (yodo acuoso). El enlace fosfito triéster también puede oxidarse con el reactivo de Beaucage en solución en acetonitrilo para dar un enlace fosforotioato triéster.

Las etapas 1 a 4 se repetían tantas veces como fuera necesario en función de la longitud de la secuencia a sintetizar.

25 Cuando la secuencia deseada estaba terminada, el soporte sólido sobre el que se encuentra el oligonucleótido se sometía a incubación en una solución de amoniaco concentrada para escindir al oligonucleótido del soporte, desproteger las bases y los grupos fosfato. El oligonucleótido en bruto obtenido de este modo se precipitaba en una solución de acetona y de perclorato de sodio antes de dosificarlo a 260 nm (Spectramax, Molecular Device).

Se purificaba entonces en columna XTerra C8 4,6 x 150 3,5 µm, 50 nmoles de oligonucleótido en bruto de una sola

vez (Equipo de HPLC Alliance, WATERS) Gradiente de acetonitrilo/TEAAc. Las fracciones más puras estaban controladas por cromatografía de intercambio iónico en columna Gen Pack Fax (Equipo de HPLC Alliance, WATERS) en un gradiente de NaCl a pH 12.

5 Las fracciones se reunían y se evaporaban y a continuación la mezcla se dosificaba de nuevo y se analizaba de nuevo en HPLC antes de utilizarla.

1A - Primera realización de la invención de acuerdo con la cual dichos primer y tercer segmento (parte de varilla) del oligonucleótido comprenden fosforamiditas alfa (figura 1)

10 Se utilizó un oligonucleótido que comprende un segundo segmento o bucle en configuración anomérica beta, y una varilla en configuración anomérica alfa (primer y tercer segmento) que forman una cadena doble antiparalela alfa/alfa (oligonucleótido A). La síntesis del oligonucleótido de acuerdo con esta primera realización se inició a partir del extremo que comprende el grupo dabsilo (figura 1, véase la flecha). El bucle se sintetizaba a continuación con las amiditas beta, a continuación, el tercer segmento se sintetizaba a partir de amiditas alfa.

1B - Segunda realización de la invención de acuerdo con la cual dicho segundo segmento (parte de "bucle") del oligonucleótido comprende fosforamiditas alfa (figura 2)

15 Con respecto a la realización anterior, el oligonucleótido inicial comprende en este caso un segundo segmento (bucle) que comprende nucleótidos alfa que hibridan de forma paralela con la diana (oligonucleótido B).

Los primer y tercer segmento (parte de varilla) comprenden nucleótidos beta. La síntesis comenzaba con amiditas beta y a continuación se sintetizaba el bucle con amiditas alfa antes de volver a la amidita beta para la síntesis de la varilla restante (figura 2, véase la flecha).

20 1C - Tercera realización de la invención de acuerdo con la cual dichos primer, segundo y tercer segmentos (partes de "varilla" y "bucle") del oligonucleótido comprenden fosforamiditas alfa

Con respecto a la realización anterior, el oligonucleótido inicial se modifica totalmente, en este caso, con nucleótidos alfa (bucle y varilla). Hibridando los nucleótidos alfa del bucle de forma paralela con la diana mientras que los de la varilla hibridan entre sí de forma anti-paralela (oligonucleótido C).

25 La síntesis comenzaba y finalizaba con amiditas alfa (figura 3).

Ejemplo 2: estudio de la resistencia de los oligonucleótidos de acuerdo con la invención contra la escisión mediante la actividad 5'-nucleasa de la Taq Polimerasa

30 El objetivo de este experimento es demostrar que un oligonucleótido modificado de acuerdo con la invención (oligonucleótidos A, B y C del ejemplo 1) no es escindido por la actividad 5'-nucleasa de la Taq Polimerasa en una reacción de amplificación enzimática *in vitro*. Diseño experimental: La secuencia diana era el plásmido pCITE que comprende un inserto de 1,2 Kb correspondiente a una secuencia genética del virus hMPV, a una concentración de $5 \cdot 10^3$ copias por tubo.

Los cebadores y sondas utilizadas eran las siguientes:

o cebador sentido: SEC ID N° 1 5'-CAT ATA AGC ATG CTA TAT TAA AAG AGT CTC-3'

35 o Cebador inverso: SEC ID N° 2 5'-CCT ATT TCT GCA GCA TAT TTG TAA TCA G-3'

40 o Sonda modificada de acuerdo con la primera realización de la invención (oligonucleótido A): SEC ID N° 3 5'-FAM-[GC TAC] CAA CTG CAG TGA CAC CCT CAT CAT TGCA [GTA GC]-Dabcilo-3' - Las secuencias nucleotídicas entre corchetes, que corresponden a los primer y tercer segmentos llamados "varilla", estaban compuestas por nucleótidos de anomería alfa. La secuencia subrayada, llamada "bucle" de anomería beta reconocía específicamente una secuencia del amplicón generada en la amplificación *in vitro*. FAM es un fluoróforo de tipo fluoresceína cuya fluorescencia puede detectarse a 530 nm. El dabcilo es una molécula aromática que impide la emisión de fluorescencia cuando se encuentra físicamente en las proximidades del fluoróforo FAM.

45 o Sonda modificada de acuerdo con la segunda realización de la invención (oligonucleótido B): SEC ID N° 4 5'-FAM-GC TAC [ACGT TAC TAC TCC CAC AGT GAC GTC AAC] GTA GC-Dabcilo-3' - La secuencia nucleotídica entre corchetes, que corresponde al segundo segmento llamado "bucle", estaba compuesta por nucleótidos de anomería alfa y reconocía específicamente a una secuencia del amplicón generado en la amplificación *in vitro*.

50 o Sonda modificada de acuerdo con la tercera realización de la invención (oligonucleótido C): SEC ID N° 5 5'-FAM-[GC TAC ACGT TAC TAC TCC CAC AGT GAC GTC AAC GTA GC]-Dabcilo-3' - La secuencia nucleotídica entre corchetes, que corresponde al primer, segundo y tercer segmentos, estaba compuesta por nucleótidos de anomería alfa. La secuencia subrayada, que corresponde al segundo segmento llamado "bucle",

reconocía específicamente una secuencia del amplicón generado en la amplificación *in vitro*.

o Sonda de control no modificada (MB): SEC ID N° 6 5'-FAM-GC TAC CAA CTG CAG TGA CAC CCT CAT CAT TGCA GTA GC-Dabcilo-3' - Esta secuencia, de anomería beta, reconocía específicamente una secuencia del amplicón generado en la amplificación *in vitro*.

5 Amplificación por PCR con detección en tiempo real en LightCycler:

Se utilizó un kit de amplificación "LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes" (Roche, Penzberg, Alemania). La preparación de la mezcla de reacción se realizaba siguiendo los procedimientos recomendados por el proveedor. En un volumen de reacción de 20 µl, se mezclaban 5-10³ copias del plásmido con los cebadores sentido e inverso (0,5 µM), la sonda nucleotídica modificada o no modificada (1 µM), 2 µl del vial 1 del kit (*enzyme mix*), 0,8 µl de MgCl₂ a 25 mM del kit y agua de calidad de PCR del kit. La mezcla de reacción se introducía a continuación en un tubo capilar y éste se introducía en el LightCycler. Para cada reacción de amplificación, se realizaba un control con la sonda no modificada (MB) en lugar de la sonda modificada (oligonucleótido A, B o C). Para cada reacción de amplificación, también se realizaba un control con adición de agua de calidad PCR del kit en lugar del plásmido diana (control negativo, "c-").

La reacción de PCR consistía en una desnaturalización inicial de 8 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 40°C durante 5 segundos y 60°C durante 60 segundos. La lectura de la fluorescencia se realizaba a 530 nm, en un punto al final de cada etapa en cada ciclo. Los resultados de fluorescencia se reflejaban a continuación en una hoja de Excel para separar los resultados por temperatura, normalizarlos y hacer una representación gráfica de los mismos. Los gráficos obtenidos para las lecturas a 40°C y 60°C servían para verificar la hibridación de la sonda con los amplicones durante la reacción de amplificación. A 95°C, por el contrario, no había hibridación posible entre la sonda y los amplicones. Cualquier aumento de señal a 95°C, con respecto al control negativo, solamente podía deberse a la escisión de la sonda. El gráfico obtenido para la lectura a 95°C servía, por lo tanto, para demostrar la escisión o no de la sonda por la actividad 5'-nucleasa de la TaqPol.

Resultados:

Los perfiles obtenidos en detección en tiempo real a 40°C se presentan en la figura 6. El eje horizontal representa el número de ciclos de amplificación, el eje vertical representa la fluorescencia detectada a 530 nm, a 40°C, en cada ciclo. En la parte superior derecha, "MB"; en la parte superior izquierda, "Oligonucleótido A"; en la parte inferior izquierda, "Oligonucleótido B"; en la parte inferior izquierda, "Oligonucleótido C". En cada gráfico se representa el control negativo correspondiente.

Los perfiles obtenidos en detección en tiempo real a 95°C se presentan en las figuras 6 a 8. En cada figura se representa en perfil correspondiente a una de las *molecular beacons* modificada, con, como control, el perfil de la *molecular beacon* no modificada y el de las muestras negativas correspondientes.

El resultado esperado en caso de hibridación es un aumento exponencial de la señal de fluorescencia a 40°C a partir del momento en el que el número de amplicones aumenta. En caso de escisión, se espera un aumento exponencial de la fluorescencia a 95°C paralelo al observado para la hibridación. Los aumentos o disminuciones lineales de la señal no corresponden a una detección cualquiera del amplicón, ya que éste se genera de forma exponencial.

Los perfiles a 40°C demostraban que las sondas nucleotídicas modificadas A, B y C así como el control no modificado MB detectaban específicamente la presencia de los amplicones obtenidos de la reacción enzimática de amplificación *in vitro*.

Los perfiles a 95°C demostraban que las sondas MB y A se escindían específicamente durante la reacción de amplificación mientras que las sondas modificadas B y C no se escindían en las mismas condiciones.

Las figuras 5 a 7 presentan la comparación de los aumentos de fluorescencia a 95°C para la sonda no modificada "MB" y, respectivamente, para la sonda modificada "oligonucleótido A", "oligonucleótido B" y "oligonucleótido C". Podía observarse un aumento específico de la fluorescencia solamente para la sonda MB y la sonda "oligonucleótido A", cuando la amplificación tiene lugar. Cuando la amplificación no tiene lugar (controles negativos, "c-") y cuando el segundo segmento llamado "bucle" de la sonda nucleotídica se modifica (oligonucleótidos B y C), no hay escisión mediante la actividad 5'-nucleasa de la Taq Polimerasa y no hay, por lo tanto, aumento de fluorescencia con respecto a la muestra negativa.

Conclusión: Las *molecular beacons* modificadas en el segundo segmento llamado "bucle" de acuerdo con la invención (oligonucleótidos B y C) hibridaban específicamente con los amplicones obtenidos del ciclado en lightcycler, dando lugar a una detección en tiempo real comparable a la obtenida con la *molecular beacon* no modificada "MB" y con la *molecular beacon* modificada en la varilla (oligonucleótido A). Las *molecular beacons* modificadas en el bucle no se escindían mediante la actividad 5'-nucleasa de la Taq Polimerasa, al contrario que la *molecular beacon* de control "MB" y que la *molecular beacon* modificada en la varilla "oligonucleótido A".

Ejemplo 3: estudio de la especificidad de la hibridación con su secuencia diana de los oligonucleótidos de

acuerdo con la invención (figura 8)Objetivo:

El objeto del experimento es comprobar si *beacons* que comprenden nucleótidos de tipo alfa son más específicas por su diana que *beacons* compuestas únicamente por nucleótidos de tipo beta.

5 La especificidad puede medirse mediante el cálculo de la diferencia de T_m (en este caso ΔT_m) entre una sonda en solución con su diana perfectamente complementaria y esta sonda en solución con una diana que comprende una variación de un nucleótido en su secuencia (en este caso, *mismatch* [emparejamiento erróneo]). Las ΔT_m se calcularán para cada sonda y para cada secuencia complementaria estudiada.

10 En nuestro caso, la especificidad se medirá mediante el valor de las ΔT_m calculadas con las sondas Oligonucleótido A, B y C y cuatro secuencias complementarias de las que una es perfectamente complementaria al segundo segmento de las y las otras tres comprenden un *mismatch* C, T o A con respecto a la complementaria perfecta.

Diseño experimental

Las secuencias de las sondas y de las complementarias utilizadas se describen en la tabla 1 a continuación.

15 La fluorescencia de soluciones que contienen las sondas, en presencia de diana perfectamente complementaria o con un *mismatch*, se midió en función de la temperatura entre 69 y 27°C en un espectrofluorímetro termoanalizador EasyQ (bioMérieux bv, Boxtel, NL). Todas las mediciones se realizaron en soluciones de 20 µl de volumen a una concentración de la sonda de 100 nM, y a la concentración de diana de 1 µM, en una solución acuosa tamponada del kit *Nasba Basic kit* (bioMérieux bv, Boxtel, NL).

20 Tabla 1: Secuencias de las sondas y complementarias utilizadas. En cursiva y negrita: nucleótidos alfa; Subrayado: *mismatch*. Todas las secuencias se escriben en sentido 5'-3'.

SEC ID	Nombres	Secuencias
9	MB	fam-CGA TG-C AAC TGC AGT GAC ACC CTC ATC ATT GCA-CAT CG-dabsilo
10	Oligo A	fam- CGA TG -C AAC TGC AGT GAC ACC CTC ATC ATT GCA- CAT CG -dabsilo
11	Oligo B	fam-GCT AC- ACG TTA CTA CTC CCA CAG TGA CGT CAA C -GT AGC-dabsilo
12	Oligo C	fam- GCT AC- ACG TTA CTA CTC CCA CAG TGA CGT CAA C-GT ACG -dabsilo
13	comp G	TT ATG ATG AGG GTG TCA CTG CAT T
14	comp C	TT ATG ATG AGG <u>CTG</u> TCA CTG CAT T
15	comp T	TT ATG ATG AGG <u>ITG</u> TCA CTG CAT T
16	comp A	TT ATG ATG AGG <u>ATG</u> TCA CTG CAT T

Resultados

Los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos se representan en la figura 8. La T_m corresponde al máximo de la primera derivada de cada perfil. Los valores de T_m obtenidos se indican en la tabla 2 a continuación.

25 Tabla 2: T_m de las diferentes sondas con las complementarias G, C, T y A. Entre paréntesis, valores de ΔT_m entre la complementaria perfecta "comp G" y las otras complementarias que contienen un *mismatch*.

Tm en °C	MB	Oligonucleótido A	Oligonucleótido B	Oligonucleótido C
comp G	56,9	56,4	44,3	42,3
comp C	44,9 (-12,0)	41,8 (-14,6)	<30	<30
comp T	47,7 (-9,2)	45,4 (-11,0)	<30	<30
comp A	46,6 (-10,3)	43,9 (-12,5)	<30	<30

En el caso de la sonda Oligonucleótido A, los valores de ΔT_m en la tabla 2 muestran una mejor especificidad que la sonda MB, alrededor de +2°C. Dado que, en los dos casos, la secuencia complementaria es de tipo beta, este aumento de la especificidad se debe ciertamente a una mayor estabilidad de la hibridación de la varilla (primer y tercer segmentos complementarios) en el caso de la sonda Oligonucleótido A, que puede observarse en la figura 14.

En el caso de las sondas Oligonucleótido B y C, se han podido obtener los valores de T_m con las secuencias complementarias que contienen un *mismatch* no, ya que la hibridación no era suficiente en la gama de temperaturas utilizada. Esto indica una especificidad muy grande, que puede verificarse en los perfiles de desnaturalización térmica en la figura 8. En estos perfiles puede observarse que solamente la complementaria perfecta "comp G" hibrida con estas sondas, mientras que las complementarias que contienen un *mismatch* no hibridan. Con respecto a los resultados obtenidos con la sonda Oligonucleótido A, estos resultados muestran que el aumento de la especificidad debido a la hibridación de una secuencia de tipo alfa es independiente de la naturaleza de la varilla, que es de tipo beta en la sonda Oligonucleótido B y de tipo alfa en la sonda Oligonucleótido C.

Conclusión

Los resultados muestran que las cuatro sondas modificadas poseen una especificidad mayor que la sonda no modificada MB (tabla 2). Este aumento de la especificidad es independiente, en nuestro caso, de la naturaleza de la varilla (primer y tercer segmentos complementarios).

Ejemplo 4: Estudio de la hibridación de la varilla de una sonda nucleica de tipo *molecular beacon* con una secuencia diana

Objetivos

Durante la hibridación de una sonda nucleica de tipo *molecular beacon* con su secuencia diana complementaria, es posible que la varilla de la sonda, tanto en el lado 5' como 3', también pueda hibridar con la diana. Esto puede producir un aumento no previsto de la estabilidad de la hibridación y por consiguiente una pérdida de la especificidad de la sonda. El ejemplo descrito en este caso sirve para mostrar que la combinación de nucleótidos alfa y beta en una sonda nucleica de tipo *molecular beacon* permite evitar este problema impidiendo la hibridación de la varilla con la diana complementaria.

Diseño experimental

Las secuencias de las sondas utilizadas son las mismas que en el ejemplo 3, y se describen en la tabla 1 anteriormente. Las secuencias complementarias utilizadas se describen en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos diana complementarios utilizados. En negrita, la secuencia complementaria del bucle de la sonda.

Nombres	Secuencias
SEC ID N° 18: comp+	5'-CGA TG TTCA ATG ATG AGG GTG TCA CTG CATT
SEC ID N° 19 comp-	5'-GTA GCT GCA ATG ATG AGG GTG TCA CTG CATT

Las secuencias complementarias comprenden una parte del lado 3' que es complementaria del bucle de la sonda, y una parte del lado 5' que es complementario, en el caso de "comp+", o no en el caso de "comp-" de un lado de la varilla de la sonda.

La fluorescencia de soluciones que contienen las diferentes combinaciones de sondas y de dianas se midió en

función de la temperatura entre 69 y 27°C en un espectrofluorímetro termoanalizador EasyQ (bioMérieux bv, Boxtel, NL). Todas las mediciones se realizaron en soluciones de 20 µl de volumen a una concentración de la sonda de 100 nM, y a la concentración de diana de 1 µM, en una solución acuosa tamponada del kit *Nasba Basic kit* (bioMérieux bv, Boxtel, NL).

5 Resultados

Los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos se representan en la figura 9. La T_m corresponde al máximo de la primera derivada de cada perfil. Los valores de T_m obtenidos se indican en la tabla 4 a continuación.

sonda diana	MB	Oligonucleótido A	Oligonucleótido B	Oligonucleótido C
varilla	37,9	46,4	54,1	54,8
comp+	64,4	60,9	51,5	57,2
comp-	60,5	60,7	51,0	50,6

Tabla 4: T_m de las diferentes sondas con las dianas complementarias comp+ y comp-

- 10 Una sonda cuyo bucle es de tipo beta hibridará en orientación antiparalela con una secuencia diana natural, forzosamente de tipo beta, como las que se ilustran en este caso. Una sonda cuyo bucle es de tipo alfa hibridará en orientación paralela con las mismas secuencias diana beta. Debido a esto, en función de la naturaleza del bucle, la varilla se encontrará frente a la secuencia de la diana en la orientación dictada por la hibridación del bucle. La varilla alfa de una sonda solamente puede hibridar, por lo tanto, con la diana natural beta si ésta es complementaria (comp+) y el bucle de la sonda también es alfa (orientación paralela). De la misma forma, la varilla beta de una sonda solamente puede hibridar con la diana natural beta si ésta es complementaria (comp+) y el bucle de la sonda también es beta (orientación antiparalela). Esto implica que la varilla de las sondas MB y Oligonucleótido C pueden hibridar con la secuencia complementaria de comp+, pero no con la secuencia no complementaria de comp- provocando una diferencia de T_m , que puede observarse en la tabla 4. La varilla de las sondas Oligonucleótido A y B no pueden hibridar con la secuencia complementaria de comp+ ni con la secuencia no complementaria de comp-, y la T_m es similar con las dos dianas, como puede verse en la tabla 4.

Conclusión

- 25 Los resultados muestran que las sondas nucleicas de tipo *molecular beacon* cuyos nucleótidos de la varilla son de anomería diferente a los nucleótidos del bucle (sondas Oligonucleótido A y B) impiden la hibridación de la varilla con la secuencia complementaria presente en la diana, incluso cuando la complementariedad es perfecta. No se observa ningún efecto negativo sobre la hibridación.

LISTA DE SECUENCIAS

- 30 <110> bioMérieux SA

<120> Nuevo oligonucleótido marcado

<130> Desconocido

35

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.3

- 40 <210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

<400> 1

5 catataagca tgctatatta aaagagtctc 30

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

10 <213> Metapneumovirus humano

<400> 2

cctatttctg cagcatattt gtaatcag 28

15 <210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

20 <400> 3

gctaccaact gcagtgacac cctcatcatt gcagtagc 38

<210> 4

<211> 38

25 <212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

<400> 4

gctacacgtt actactccca cagtgacgtc aacgtagc 38

30

<210> 5

<211> 38

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

35

<400> 5

gctacacgtt actactccca cagtgacgtc aacgtagc 38

<210> 6
<211> 38

5 <212> ADN
<213> Metapneumovirus humano

<400> 6
gctaccaact gcagtgacac cctcatcatt gcagtagc 38

10 <210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Metapneumovirus humano

15 <400> 7
acgttactac tcccacagtg acgtcaacgt agc 33

<210> 8

20 <211> 27
<212> ADN
<213> Metapneumovirus humano

<400> 8

25 tgcaatgatg aggggtgcac tgcgggt 27

<210> 9
<211> 38
<212> ADN

30 <213> Metapneumovirus humano

<400> 9
cgatgcaact gcagtgacac cctcatcatt gcacatcg 38

35 <210> 10
<211> 38

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

<400> 10

5 cgatgcaact gcagtgcac cctcatcatt gcacatcg 38

<210> 11

<211> 38

<212> ADN

10 <213> Metapneumovirus humano

<400> 11

gctacacgt actactccca cagt gacgt c aac gt agc 38

15 <210> 12

<211> 38

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

20 <400> 12

gctacacgtt actactccca cagtgcgac aacgtacg 38

<210> 13

<211> 24

25 <212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

<400> 13

ttatgatgag ggtgtcactg catt t 24

30

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Metapneumovirus humano

35

<400> 14

	ttatgatgag gctgtcact catt	24
	<210> 15	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Metapneumovirus humano	
	<400> 15	
10	ttatgatgag gttgtcactg catt	24
	<210> 16	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Metapneumovirus humano	
15	<400> 16	
	ttatgatgag gatgtcactg catt	24
	<210> 17	
20	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Metapneumovirus humano	
	<400> 17	
25	cgatgtgcaa tgatgagggt gtcactgcat t	31
	<210> 18	
	<211> 31	
	<212> ADN	
30	<213> Metapneumovirus humano	
	<400> 18	
	gtagctgcaa tgatgagggt gtcactgcat t	31
35		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oligonucleótido marcado que comprende un primer segmento nucleotídico, un segundo segmento nucleotídico, complementario de una secuencia diana, y un tercer segmento nucleotídico, complementario de dicho primer segmento nucleotídico, **caracterizado porque** comprende un fluoróforo, un extintor y al menos un nucleósido de anomería alfa.
- 10 2. Oligonucleótido marcado de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichos primer y tercer segmentos están a uno y otro lado del segundo segmento.
- 15 3. Oligonucleótido marcado de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** dicho segundo segmento comprende al menos un nucleósido de anomería alfa.
4. Oligonucleótido marcado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el fluoróforo está en un extremo de dicho oligonucleótido y el extintor está en el otro extremo de dicho oligonucleótido.
- 20 5. Oligonucleótido marcado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicho fluoróforo es una fluoresceína.
- 25 6. Oligonucleótido marcado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** dicho extintor es dabsilo.
7. Oligonucleótido marcado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** dicho primer segmento comprende de 3 a 8 nucleótidos, dicho segundo segmento comprende de 10 a 35 nucleótidos, y dicho tercer segmento, cuando está presente, comprende de 3 a 8 nucleótidos.
- 30 8. Procedimiento para detectar un material nucleico en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:
 - a) se extrae el material nucleico de una muestra biológica,
 - b) se amplifica el material nucleico para obtener amplicones de al menos una secuencia diana del material nucleico
 - c) se utiliza, simultáneamente a la etapa b) o posteriormente a la etapa b), al menos un oligonucleótido marcado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7
 - 35 d) se detecta la presencia de dichos amplicones.

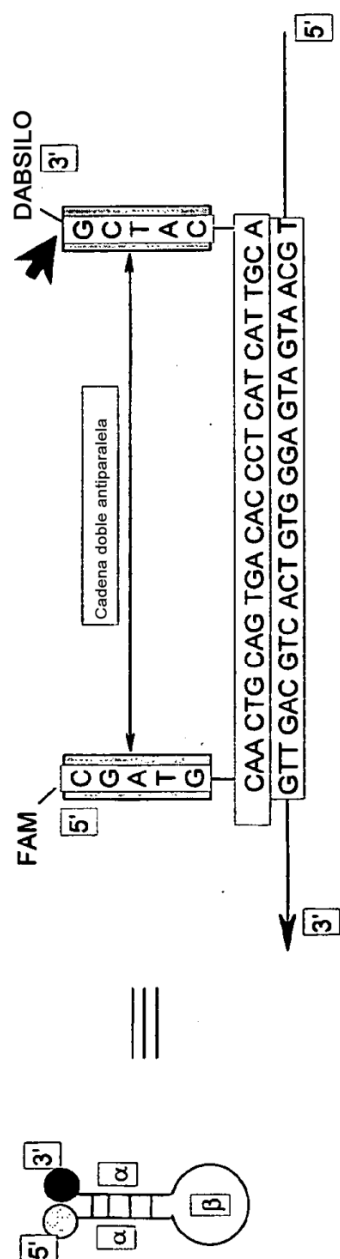


Figura 1

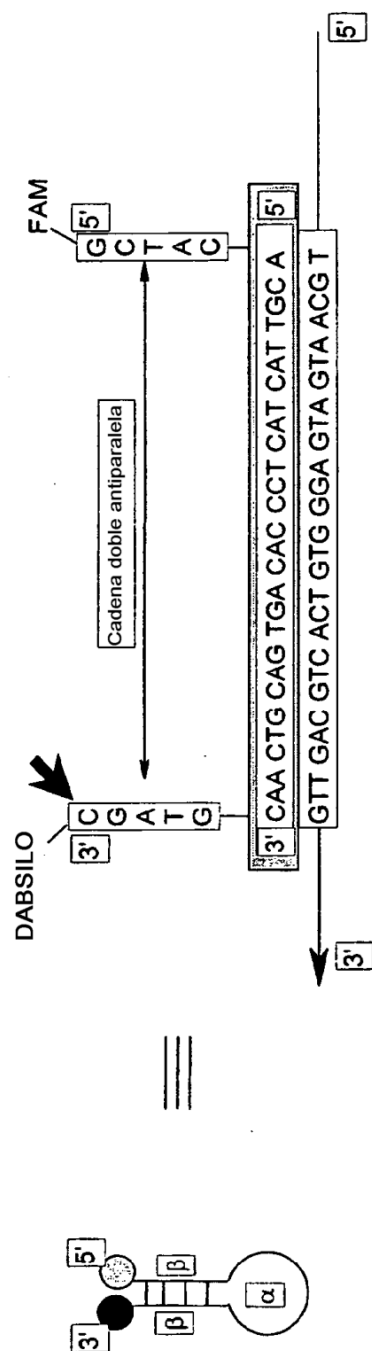


Figura 2

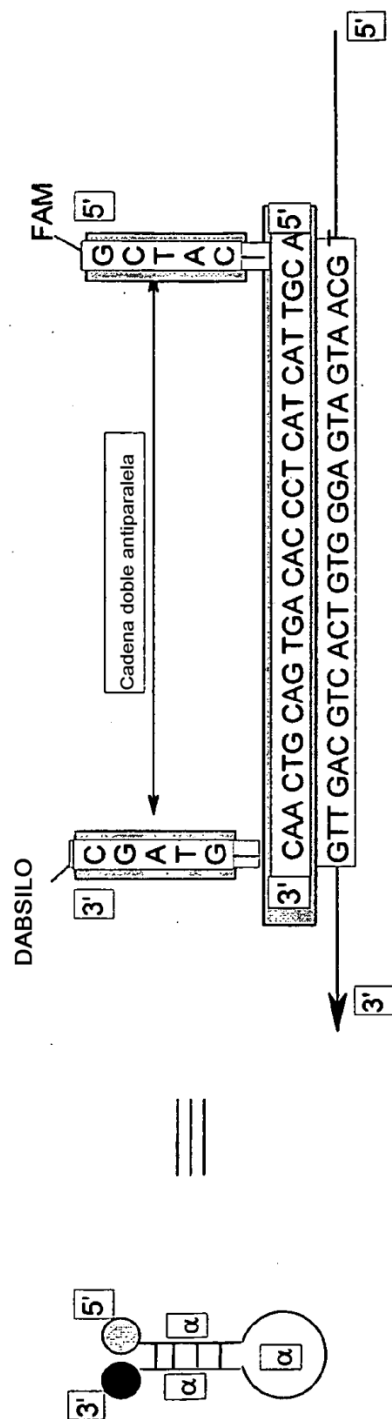


Figura 3

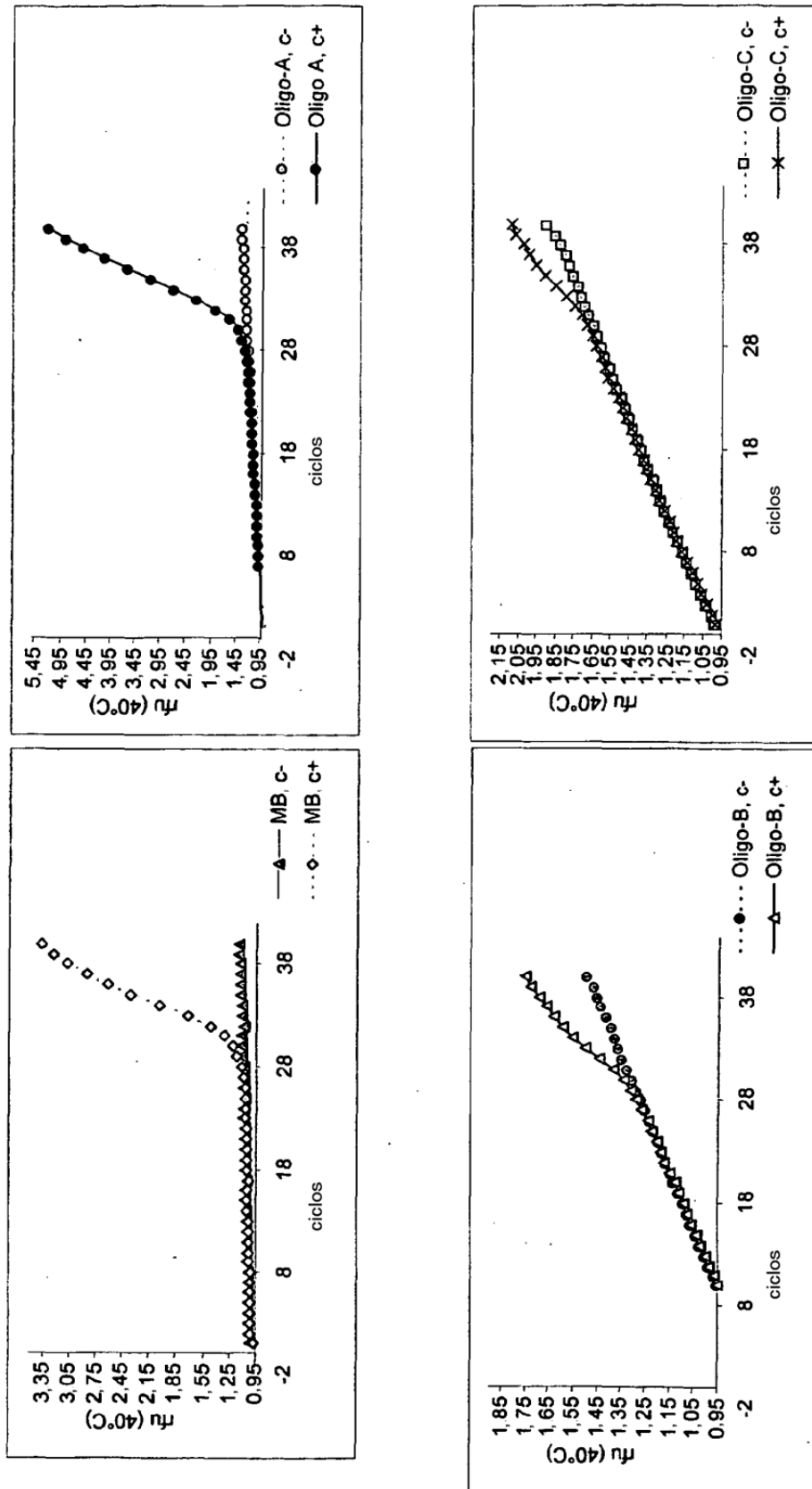


Figura 4

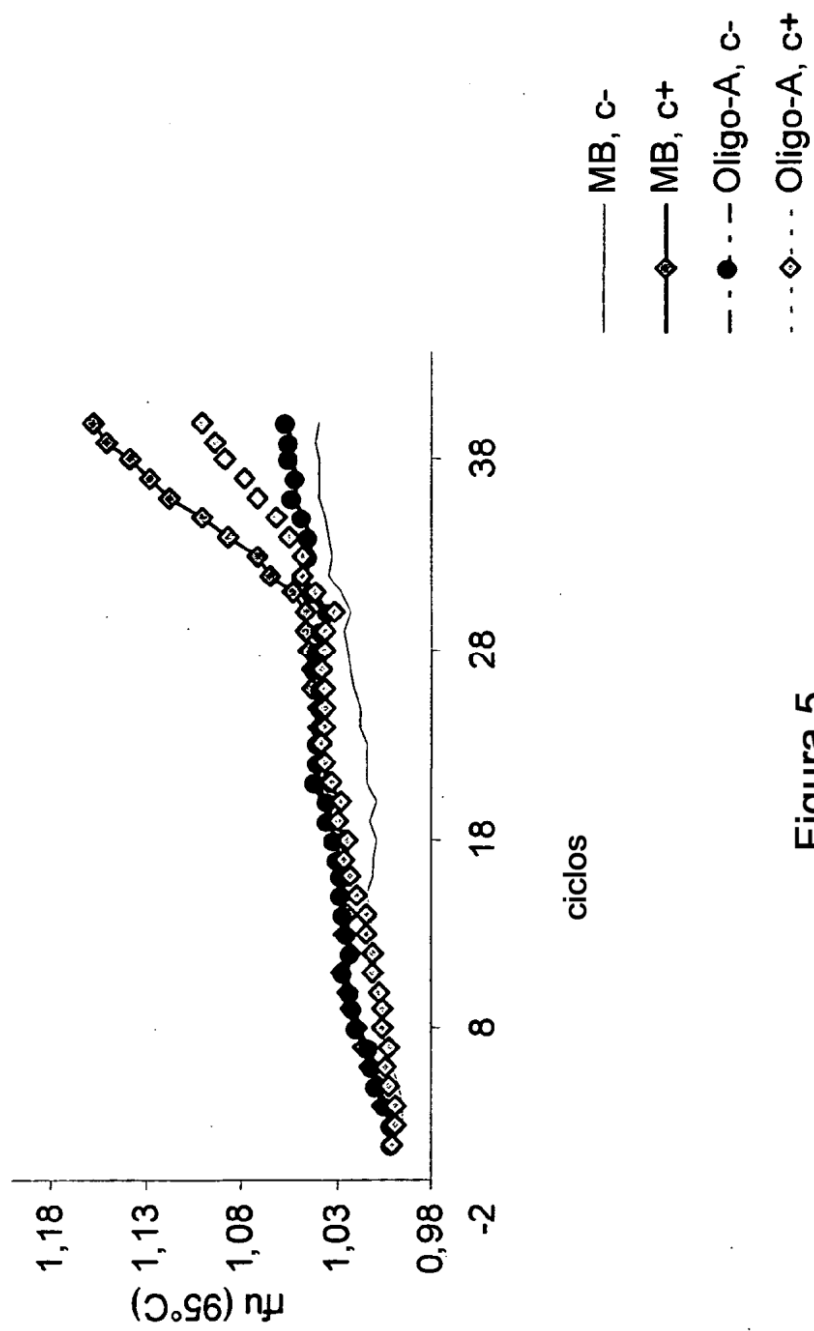


Figura 5

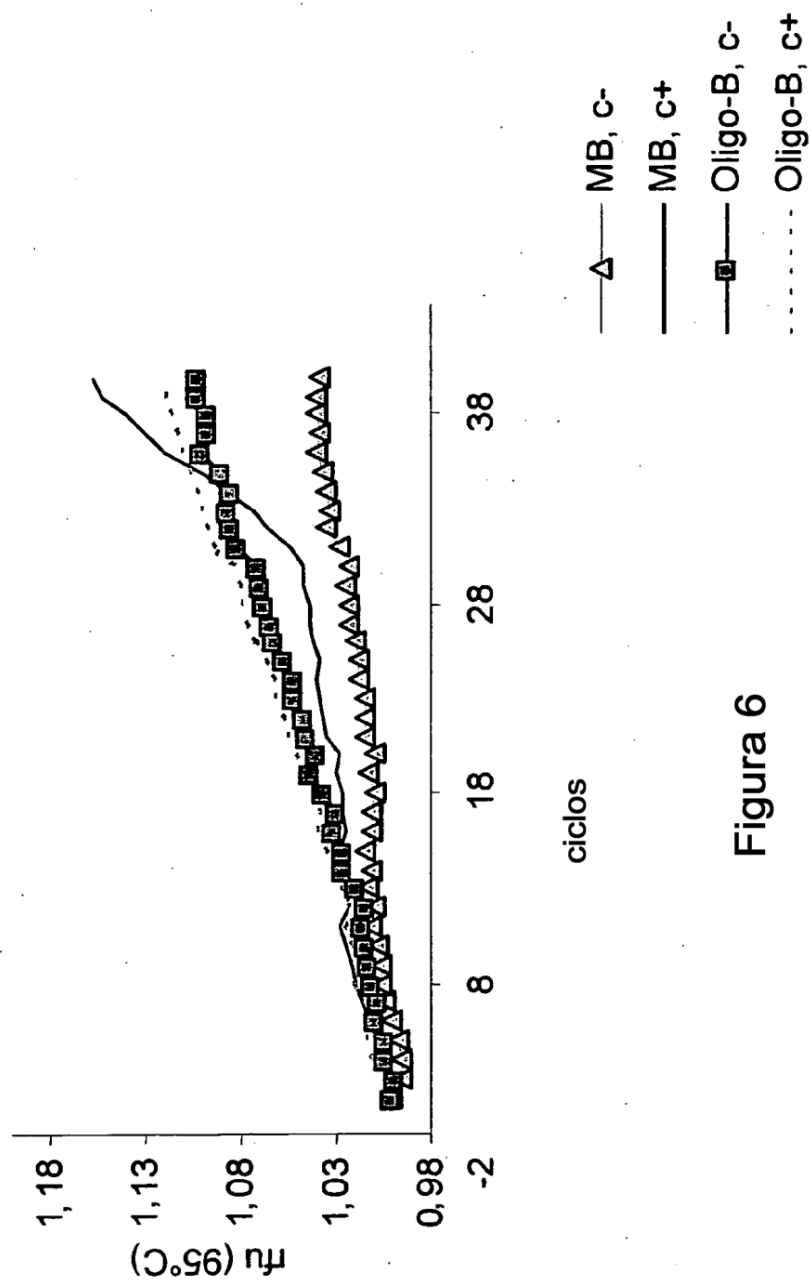


Figura 6

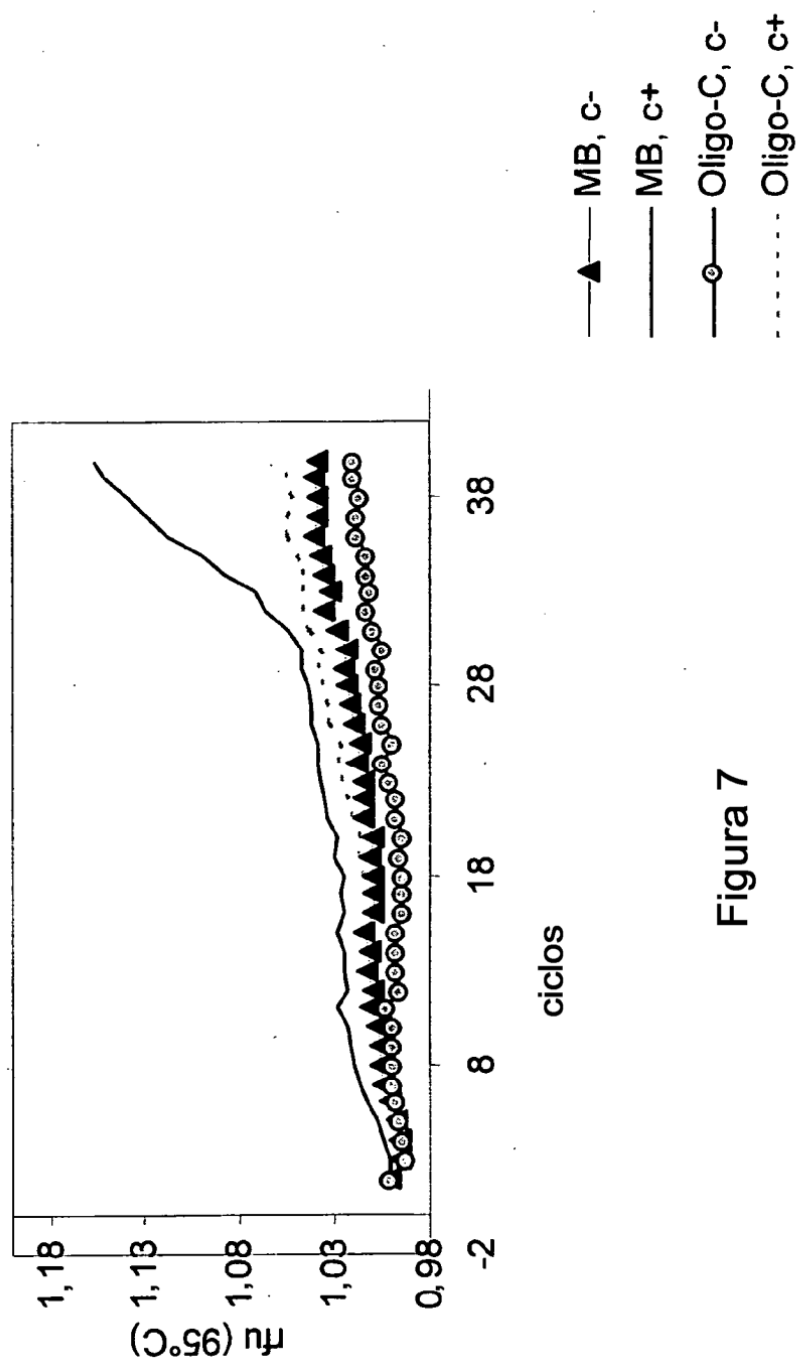


Figura 7

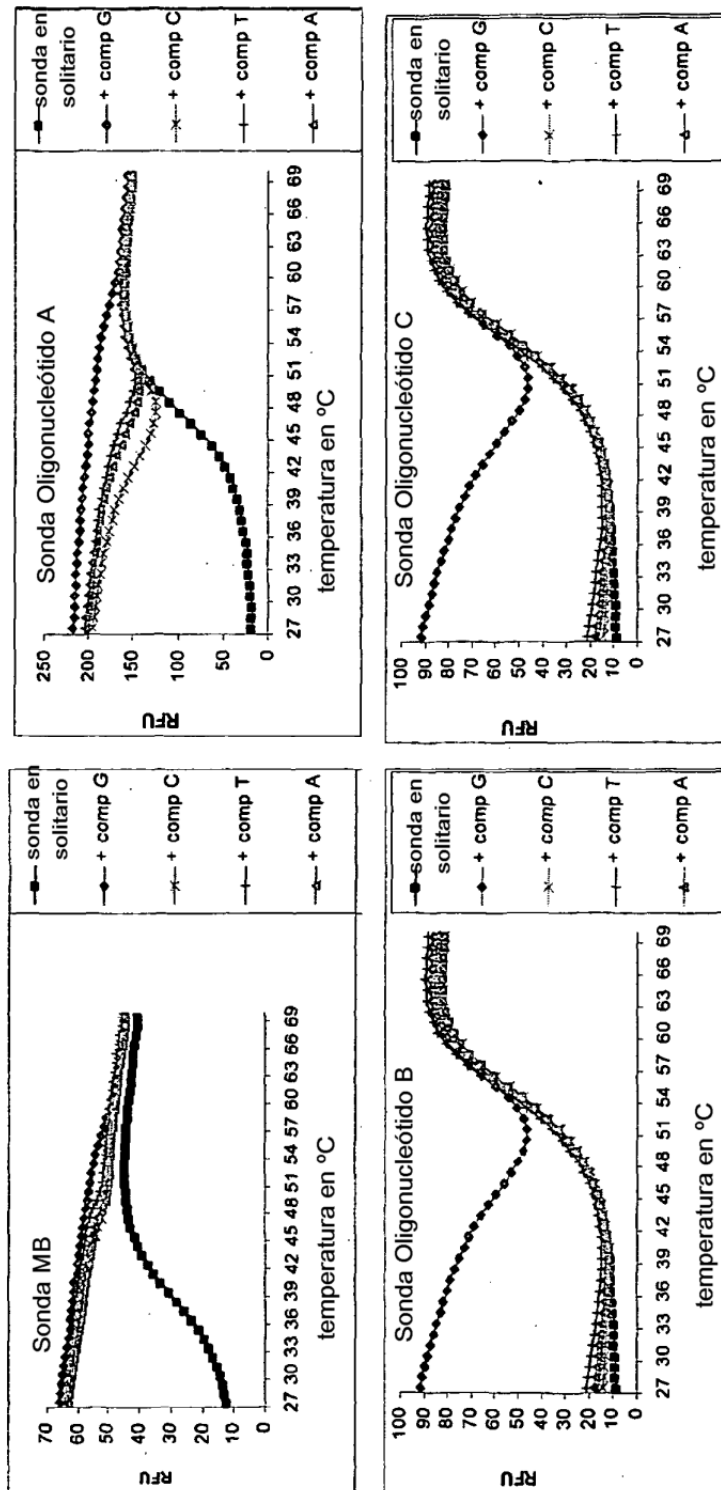


Figura 8

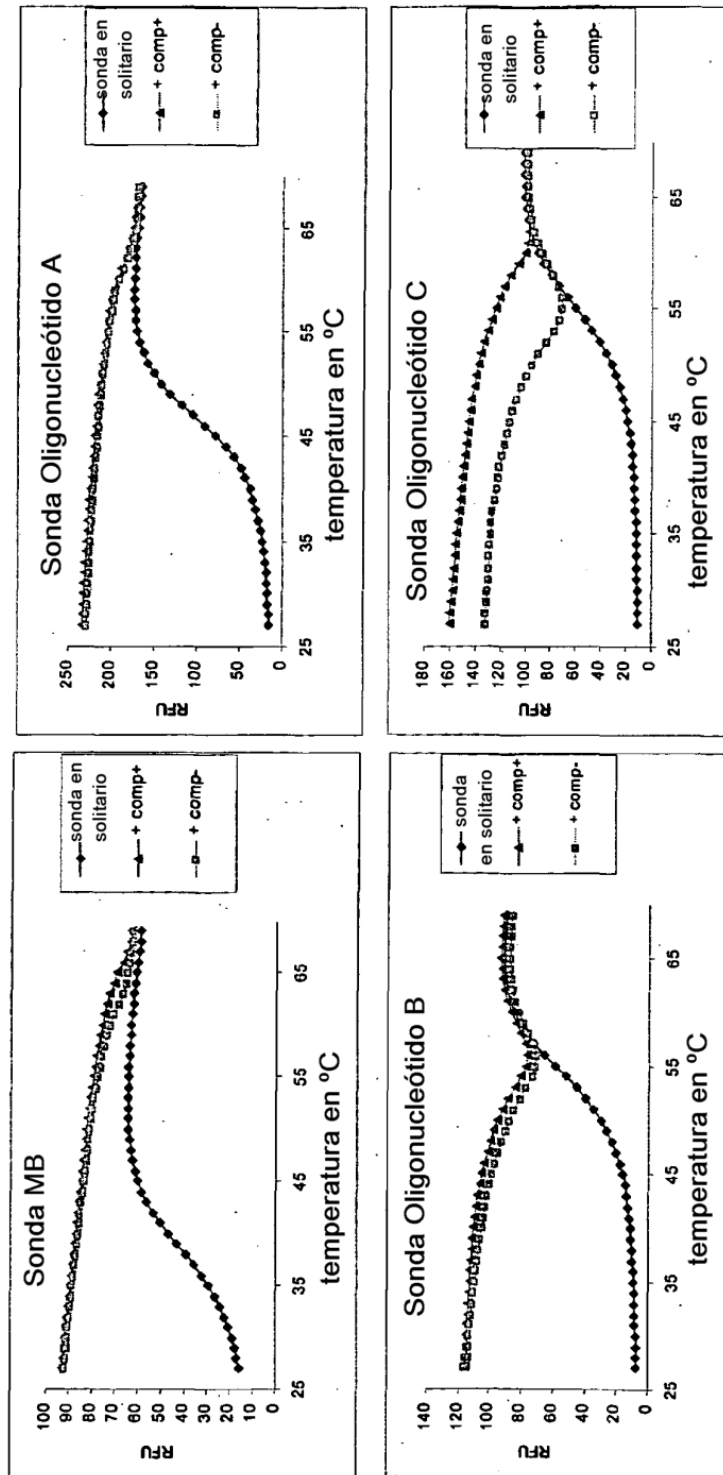


Figura 9

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5866336 A [0007]
- US 6117635 A [0007]
- WO 8804301 A [0037]
- WO 9015813 A [0037]
- WO 0005338 A [0053]
- WO 9953304 A [0053]
- WO 9915321 A [0053]
- US 5234809 A [0054]
- US 4672040 A [0054]
- US 5750338 A [0054]
- WO 9745202 A [0054]
- WO 9935500 A [0054]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **Tyagi, S.; Hramer, FD.** *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 303-308 [0006]
- **Marras, SA. et al.** *Genet Anal.*, 1999, vol. 14, 151-156 [0006]
- **Tyagi; Kramer.** *Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 303-308 [0031]
- *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28 (19), 3752-3761 [0032]
- **Myakishev M.** *Genome Research*, 2001, vol. 1, 163-169 [0032]
- **Boom R. et al.** *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 495-503 [0054]
- **Levison PR et al.** *J. Chromatography*, 1998, 337-344 [0054]
- **Beaucage; Lyer.** *Tetrahedron*, 1992, vol. 48, 223-2311 [0069]