



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 737**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05785367 .3**  
96 Fecha de presentación : **11.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1789587**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Métodos de amplificación.**

30 Prioridad: **13.08.2004 US 601206 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.10.2011**

73 Titular/es: **EPOCH BIOSCIENCES, Inc.**  
**21720 23rd Drive SE, Suite 150**  
**Bothell, Washington 98021, US**

72 Inventor/es: **Mahoney, Walter;**  
**Vermeulen, Nicolaas M.J. y**  
**Afonina, Irina**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 737 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

Métodos de amplificación

## FUNDAMENTO DE LA INVENCION

5 La eficiente amplificación (multiplicación) mediante PCR se requiere de un modo particular en aplicaciones biológicas en las que se precisa una detección altamente sensible y precisa. En la mayor parte de los programas de diseño de cebadores y sondas se recomienda diseñar primero las sondas y después se diseñan los cebadores próximos a las sondas sin secuencias solapantes (superpuestas) (p. ej. Primer Express Software Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los métodos de amplificación mediante PCR se emplean con profusión en la industria del diagnóstico. De una forma inesperada, los autores de la presente invención han descubierto que el cebador solapante (superpuesto) y la sonda dan aún una eficaz PCR, expandiendo las oportunidades de diseño de sonda y cebador particularmente en entornos de secuencia *challenging*. El método de PCR y sus aplicaciones clínicas han sido ya descritos (patente de EE.UU. nº 4.683.202; Lynch J R, Brown J M. *J Med. Genet.*, 27: 2 - 7 (1990); Yang S, Rothman R E. *Lancet Infect Dis.*, 4: 337 - 48 (2004)).

15 La representación esquemática de la sonda superpuesta y el cebador en un nuevo método de amplificación de la invención se muestra en la Figura 1.

Las sondas 5'-*minor groove binder* (MB) (ligando del surco menor)-*Quencher* (apagador) (Q)-oligonucleótido-Fluoróforo (FI)-3' o 5'-MB-FI-oligonucleótido-Q-3' o 5'-FI-oligonucleótido-Q-MB-3' no han sido solapadas o superpuestas con cebadores. Se sugiere en la bibliografía sobre amplificación mediante PCR que "se ha de evitar la complementariedad en los extremos 3' de pares de cebadores ya que ésta promueve la formación de artefactos cebador-dímero y reduce el rendimiento en los productos deseados (Innis, M. y Gelfand, D. Optimization of PCR en Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T., Editores. PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS. Academic Press, San Diego, CA, páginas 3 - 12, 1989.). Como la sonda y el cebador tienen secuencias complementarias superpuestas y secuencias 3' disponibles, era de esperar que las sondas 5'-MB-Q-oligonucleótido-FI-3' o 5'-MB-FI-oligonucleótido-Q-3' o 5'-FI-oligonucleótido-Q-MB-3' que se solapan con un cebador darían una escasa amplificación. Sin embargo se observó de una forma inesperada que tiene lugar una eficiente amplificación en el caso de la Figura 1b. Sin vincularse a ninguna teoría, los autores de la presente invención sospechan que la sonda que contiene un ligando MB, Q y un FI tiene una conformación apretada en una solución en la que estos componentes están en estrecha proximidad. Los autores de la presente invención han demostrado que tal sonda en solución es apagada a partir de temperaturas que están en el intervalo de 25°C a 95°C, lo que sugiere que solapamientos o superposiciones de 1 a aproximadamente 7 bases no bastan para superar la conformación de la sonda estable en solución para permitir la formación de enlaces de hidrógeno. En la Figura 1a, el dímero Cebador-Sonda no debe dar lugar a ningún artefacto. El extremo 3' no está disponible para el cebado. Sorprendentemente, este tipo de diseño puede proporcionar una buena amplificación.

Los documentos WO 03/062445 y US 2003/0175728 A1 están relacionados con sondas de detección lineal en tiempo real: sondas que contienen 5' *minor groove binder* (ligando del surco menor) para análisis por PCR. El documento de Afonina et al. (2002) *Proceedings of SPIE*, 4626: 322 a 330 está relacionado con la detección de DNA por fluorescencia desencadenada por hibridación con sondas de ligando del surco menor. El documento de Afonina et al. (2002) *PharmaGenomics*, enero/febrero 48-54 está relacionado con el tipaje preciso por PCR en tiempo real. El documento de Afonina et al. (2002) *Biotechniques* 32 (4): 940 - 944 está relacionado con sondas de DNA conjugado con ligando del surco menor para la detección cuantitativa de DNA por fluorescencia desencadenada por hibridación. El documento de Afonina et al. (2002) 25: 268 - 274 está relacionado con la detección de polimorfismo de nucleótido simple con ensayos MGB Eclipse™.

## BREVE SUMARIO DE LA INVENCION.

45 La presente invención describe el método en el que las secuencias de la sonda de oligonucleótido y un cebador de oligonucleótido son superpuestas con aproximadamente una a aproximadamente 7 bases en una amplificación basada en polimerasa. Las sondas y cebadores de la invención son opcionalmente oligonucleótidos modificados. En un grupo de realizaciones, las secuencias del cebador son superpuestas y la diana amplificada se detecta, bien sea indirectamente o con un agente de unión de DNA.

50 Los cebadores y sondas de la invención son oligonucleótidos de aproximadamente 5 a 40 bases, más preferentemente de 5 a 30 bases, con la condición de que sean compatibles con la amplificación por polimerasa.

En una realización de la invención, los cebadores y sondas de oligonucleótido contienen las bases naturales, es decir guanina, citosina, adenina, timina o uracilo.

En otra realización, las sondas y cebadores de la invención contienen una o más bases no naturales, promiscuas o universales.

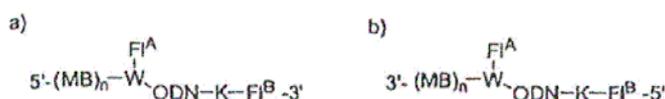
55 En otra realización la sonda es una sonda de transferencia de resonancia fluorescente (FRET: fluorescence resonance transfer probe) que contiene un fluoróforo con longitudes de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a

aproximadamente 900 nm, y un *quencher* (apagador) con longitudes de onda de absorbancia de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm. Los fluoróforos y los apagadores son disponibles a partir de fuentes comerciales (p. ej. Molecular Probes, Eugene, OR; Epoch Bioscience, Bothell, WA). Típicamente las sondas tienen una longitud de aproximadamente 8 a 30 bases.

- 5 En otra realización más, la diferencia en las propiedades termodinámicas ( $\Delta G$ ) es suficientemente grande para permitir la superposición o solapamiento sustancial de las secuencias de la sonda y el cebador en la amplificación por PCR.

10 La sonda FRET de detección contiene un ligando del surco menor, un fluoróforo y un apagador. Los conjugados de sonda preferidos tienen la fórmula que se indica en la Fórmula I, en la que  $Fl^A$  y  $Fl^B$  pueden ser un fluoróforo o bien un apagador, con la condición de que el conjugado contenga al menos un apagador y al menos un fluoróforo, y  $n$  sea 0 o 1.

Fórmula I



15 Los dos cebadores solapan de 1 a 7 bases. La diana amplificada se detecta por medio de un reactivo de unión de ácido nucleico. Alternativamente, el material amplificado puede ser detectado indirectamente utilizando un cebador biotinilado y la detección enzimática conocida en la técnica.

20 En otra realización más, el cebador y la sonda superpuestos se usan en la amplificación de dianas con control continuado de la sonda. En otra realización más, el cebador y la sonda superpuestos se usan para amplificar dianas estrechamente relacionadas para la discriminación de disparidades usando al menos una sonda. Las dianas relacionadas son aquellas en las que las secuencias diana difieren en una a tres disparidades, preferentemente en una o dos disparidades. En algunas realizaciones los polimorfismos de nucleótidos simples se determinan por análisis de la curva de fusión post amplificación midiendo la dependencia de la emisión de fluorescencia de cada sonda con la temperatura.

25 En una realización relacionada, el cebador y la sonda superpuestos se usan para amplificar dianas de ácidos nucleicos para la detección del punto final de la sonda fluorescente.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS.

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de la situación de cebador y sonda en una diana, con una secuencia de cebador solapada con una secuencia de sonda (Figuras 1a y 1b), superposición de cebador-cebador (Figura 1c) y solapamiento de sonda con dos secuencias de cebador (Figura 1d).

30 La Figura 2 proporciona los resultados de un ensayo MGB-Eclipse usando los cebadores y las sondas que se proporcionan en la Tabla 2.

La Figura 3 proporciona los resultados de una amplificación por PCR del virus BK.

La Figura 4 proporciona un tipaje de polimorfismo de curva de fusión post amplificación por PCR del polimorfismo de MMP-3 en 102 muestras de DNA.

35 La Figura 5 proporciona la relación de señal fluorescente/ruido de una placa post PCR, leída a 25°C en un aparato ABI 7900 para diferentes concentraciones de RNA de Influenza A.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION.

40 Como se señaló antes, la presente invención proporciona métodos de amplificación y métodos de hibridación en los que una sonda de oligonucleótido y un cebador de oligonucleótido tienen secuencias que son solapadas con aproximadamente una a aproximadamente 7 bases en una amplificación basada en polimerasa. Las sondas y cebadores de la invención son opcionalmente oligonucleótidos modificados. Generalmente, los cebadores y sondas de la invención son oligonucleótidos de aproximadamente 5 a 40 bases, más preferentemente de 5 a 30 bases, que son compatibles con la amplificación con polimerasa. En varias realizaciones, los cebadores y sondas de oligonucleótidos contienen las bases naturales, es decir guanina, citosina, adenina, timina o uracilo; mientras que en otras realizaciones las sondas y cebadores de la invención contienen una o más bases no naturales, promiscuas o universales. En algunas realizaciones, el solapamiento entre una sonda de oligonucleótido y un cebador de oligonucleótido, o entre dos cebadores, es más corto que la longitud del cebador o de los cebadores.

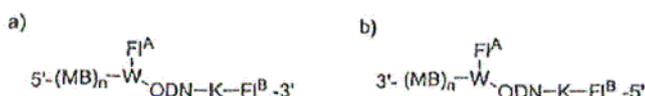
50 En otra realización, la sonda es una sonda de transferencia de resonancia fluorescente (FRET) que contiene un fluoróforo con una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm, y un apagador con una longitud de onda de absorbancia de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm. Los

fluoróforos y los apagadores son disponibles a partir de fuentes comerciales (p. ej. Molecular Probes, Eugene, OR; Epoch Bioscience, Bothell, WA). Típicamente las sondas tienen una longitud de aproximadamente 8 a 40 bases, y en algunas realizaciones las sondas tienen una longitud de aproximadamente 8 a 30 bases.

5 En otra realización más, la diferencia en las propiedades termodinámicas ( $\Delta G$ ) es suficientemente grande para permitir el solapamiento sustancial de las secuencias de la sonda y el cebador en la amplificación por PCR.

La sonda FRET contiene un ligando del surco menor, un fluoróforo y un apagador. Los conjugados de sonda tienen la fórmula que se indica en la Fórmula I, en la que  $F1^A$  y  $F1^B$  pueden ser un fluoróforo o bien un apagador, de forma que el conjugado contenga solamente un apagador y un fluoróforo, y  $n$  es 0 o 1.

Fórmula I



10

#### Oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados.

15 Los términos oligonucleótido, polinucleótido y ácido nucleico se usan indistintamente para referirse a polímeros monocatenarios o bicatenarios de DNA o RNA (o ambos), incluyendo polímeros que contienen nucleótidos modificados o no naturales, o a cualquier otro tipo de polímero capaz de un emparejamiento de bases estable con DNA o RNA, incluyendo, pero sin limitarse a ello, ácidos nucleicos peptídicos que son descritos por Nielsen et al. *Science* 254:1497-1500 (1991); oligómeros biciclo DNA (Bolli et al., *Nucleic Acids Res.* 24: 4660 - 4667 (1996)) y estructuras relacionadas. Para los conjugados usados en la presente invención, se une un resto de ligando del surco menor (MB) bien sea al extremo 3' o bien al extremo 5' de la sonda de oligonucleótido, y un apagador o una etiqueta fluorescente se une al extremo 3', al extremo 5', o en una porción interna de la sonda de oligonucleótido.

20 En el método de la presente invención se prefieren oligonucleótidos de DNA que son monocatenarios y tienen una longitud de 100 nucleótidos o menos, más preferentemente 40 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 30 nucleótidos o menos, y lo más preferentemente 20 nucleótidos o menos, siendo un límite inferior aproximadamente 5 nucleótidos.

25 Los cebadores de oligonucleótido y los conjugados de oligonucleótido que contienen un par fluoróforo/apagador con un ligando del surco menor pueden comprender también una o más bases modificadas, además de las bases naturales adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. Se considera que las bases modificadas son aquellas que difieren de las bases naturales (de origen natural) por adición o delección (borrado) de uno o más grupos funcionales, diferencias en la estructura de anillos heterocíclicos (p. ej. sustitución de un carbono por un heteroátomo, o viceversa), y/o unión de una o más estructuras de brazo enlazador a la base). Los nucleótidos modificados preferidos son aquellos que están basados en una estructura pirimidínica o en una estructura purínica, siendo esta última más preferentemente 7-deazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas (descritas en el documento PCT WO 01/84958); y también descritas en la patente de EE.UU. n° 6.127.121.

35 Las bases modificadas más preferidas para su uso en la presente invención incluyen el análogo de guanina 6 amino 1H-pirazolo[3,4 d] pirimidin 4(5H)ona (ppG o PPG, también Super G) y el análogo de adenine 4 amino 1H-pirazolo[3,4 d]pirimidina (ppA o PPA). También puede usarse el análogo de xantina 1H- pirazolo [5,4 d]pirimidin 4(5H)-6(7H)-diona (ppX). Estos análogos de base, cuando están presentes en un oligonucleótido, refuerzan la hibridación y mejoran la discriminación de disparidades. Todas las formas tautómeras de bases de origen natural, bases modificadas y análogos de bases pueden incluirse en los conjugados de oligonucleótido de la invención. Otras bases modificadas útiles en la presente invención incluyen 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, PPPG; 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, HOPPPG; 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d] pirimidina-4-ona, NH2PPPG; 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, PPPA; 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil) pirazolo[3,4-d]pirimidina, HOPPPA; 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, NH2PPPA; 3-prop-1-inilpirazolo [3,4-d]pirimidina-4,6-diamino, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> PPPA; 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> PPPAOH; 3-(2-aminoetinil)pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> PPPANH 2 ; 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, PU; 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, HOPU; 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidina-2-ona, PC; 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, HOPC; y 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, NH<sub>2</sub>PC; 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol [3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, CH<sub>3</sub>OPPPA; 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, CH<sub>3</sub>OPPPG; 4,(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, Super A; 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona; 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidina-2,4-diona, Super T; 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPAI); 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPABr); 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPACl); 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPAI); 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPABr); y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPACl).

50

Además de las bases modificadas señaladas anteriormente, los oligonucleótidos de la presente invención pueden tener un esqueleto de azúcar o de restos glicosídicos, preferentemente 2-desoxirribofuranósidos en los que todos los enlaces internucleótidos son enlaces fosfodiéster naturales. En realizaciones alternativas, sin embargo, los grupos 2-desoxi-β-D-ribofuranosa están reemplazados por otros azúcares, por ejemplo, β-D-ribofuranosa. Además, puede estar presente β-D-ribofuranosa en la que los 2-OH del resto de ribosa están alquilados con un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> (2-(O—C<sub>1-6</sub> alquil) ribosa) o con un grupo alqueno C<sub>2-6</sub> (2-(O—C<sub>2-6</sub> alqueno)ribofuranosa), o está reemplazado por un grupo fluoro (2-fluororribosa). Azúcares formadores de oligómeros relacionados, útiles en la presente invención, son aquellos que están "bloqueados (*locked*)", es decir, que contienen un puente de metileno entre C-4' y un átomo de oxígeno en C-2'. También pueden usarse otros restos de azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido, y son conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, α-D-arabinofuranósidos, α-2'-desoxirribofuranósidos o 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen α-D-arabinofuranósidos pueden prepararse como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos se describen en Chen et al. *Nucleic Acids Res.* 23: 2661 - 2668 (1995). También se han descrito procedimientos de síntesis para ácidos nucleicos bloqueados (Singh et al. *Chem. Comm.*, 455 - 456 (1998); Wengel J., *Acc. Chem. Res.*, 32: 301 - 310 (1998)) y oligonucleótidos que contienen 2'-halo-2'-desoxirribofuranósidos (Palissa et al., *Z. Chem.*, 27: 216 (1987)). El esqueleto de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos en el presente texto puede también modificarse de forma que los oligonucleótidos contengan enlaces fosforotioato y/o metilfosfonatos y/o fósforoamidades (Chen et al., *Nucl. Acids Res.*, 23: 2662 - 2668 (1995)). También están dentro del alcance de la presente invención combinaciones de enlaces oligonucleótido. Hay otras modificaciones del esqueleto que son conocidas por los expertos en la técnica.

En otro grupo de realizaciones, las bases modificadas descritas en el presente texto se incorporan en PNA y en quimeras DNA/PNA para equilibrar los valores de las T<sub>m</sub>s y proporcionar oligonucleótidos modificados que tienen una mejor discriminación de la disparidad. Se han usado varias formas modificadas de DNA y análogos del DNA en el intento de superar algunos de los inconvenientes del uso de moléculas de DNA como sondas y cebadores. Entre estas están los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs, conocidos también como ácidos nucleicos de poliamida). Nielsen et al. *Science* 254: 1497 - 1500 (1991). Los PNAs contienen unidades de bases heterocíclicas, como se encuentran en el DNA y el RNA, que están unidas por un esqueleto de poliamida, en vez del esqueleto de azúcar -fosfato característico del DNA y el RNA. Los PNAs son capaz de efectuar la hibridación con secuencias diana de DNA y RNA complementarios y, de hecho, se hibridan más fuertemente que la sonda de ácido nucleico correspondiente. La síntesis de oligómeros de PNA y monómeros reactivos usados en la síntesis de oligómeros de PNA ha sido descrita en las patentes de EE.UU. n.º 5.539.082, 5.714.331, 5.773.571, 5.736.336 y 5.766.855. Ya han sido resumidas soluciones alternativas a la síntesis de PNA, quimeras de DNA/PNA y monómeros para la síntesis de PNA. Uhlmann et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2796 - 2823 (1998). En consecuencia, el uso de cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (p. ej., PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales, modificación de azúcar, modificación del esqueleto o un ligando del surco menor para equilibrar el valor de T<sub>m</sub> de un DNA, un PNA o una quimera de DNA/PNA, está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de síntesis necesarios para la síntesis de unidades monómeras de bases modificadas requeridas para la síntesis de ácido nucleico, PNA y quimeras PNA/DNA, son disponibles en la técnica, véanse los métodos en esta solicitud y Uhlmann et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2796 - 2823 (1998).

Para los usos descritos en el presente texto, y como se señaló antes, los oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados tendrán preferentemente de 5 a 100 bases, más preferentemente de 5 a 40 bases, aún más preferentemente de 5 a 30 bases, e incluso más preferentemente de 5 a 20 bases. En algunas realizaciones, las porciones de oligonucleótido de las sondas/conjugados tendrán de 5 a 15 bases. En algunas realizaciones, las porciones de oligonucleótido tendrán 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 bases o bases modificadas.

Se contempla en la presente invención la capacidad de diseñar sondas y cebadores para el método de la presente invención de una manera predecible usando un algoritmo que puede dirigir el uso o la incorporación de bases modificadas, ligandos del surco menor, fluoróforos y/o apagadores, basándose en sus propiedades termodinámicas, ha sido descrita en la patente de EE.UU. n.º 6.683.173. En consecuencia, el uso de cualquiera combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (p. ej., PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales, modificación del azúcar, modificación del esqueleto o un ligando del surco menor para equilibrar el valor de T<sub>m</sub> (p. ej., dentro de aproximadamente 5 a 8° C) de un producto hibridado con un ácido nucleico, PNA o quimera de DNA/PNA.

#### Ligandos del surco menor.

Las sondas/conjugados usadas en el método de la presente invención tendrán un ligando del surco menor (MB) unido covalentemente. Se ha descrito en la bibliografía una diversidad de ligandos del surco menor adecuados. Véase, por ejemplo, Kuttyavin, et al. patente de EE.UU. n.º 5.801.155; Wemmer, D. E., y Dervan P. B., *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 355 - 361 (1997); Walker, W. L., Kopka, J. L. y Goodsell, D. S., *Biopolymers*, 44: 323 - 334 (1997); Zimmer, C y Wahnert, U. *Prog. Biophys. Molec. Bio.* 47: 31 - 112 (1986) y Reddy, B. S. P., Dondhi, S. M., y Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84: 1 - 111 (1999).

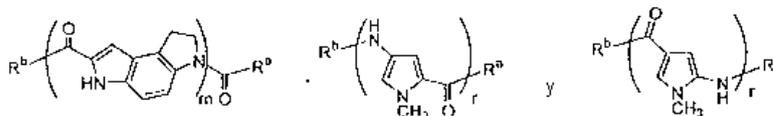
Métodos adecuados para unir MBs (así como grupos *reporter* o informadores, tales como fluoróforos y apagadores descritos más adelante) por medio de enlazadores a oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.512.677, 5.419.966, 5.696.251, 5.585.481, 5.942.610 y 5.736.626.

5 El MB está unido generalmente a la posición 5' de la porción de oligonucleótido por medio de un grupo de enlace adecuado, si bien la unión puede hacerse a otras posiciones en la porción de oligonucleótido. La unión en el extremo 5' no solo proporciona un beneficio de estabilidad del híbrido, ya que la fusión de un dúplex de oligonucleótido comienza en los términos, sino que también reduce y/o previene la digestión de la sonda con nucleasa durante las reacciones de amplificación.

10 La localización de un MB dentro de un conjugado MB oligonucleótido puede también afectar a las propiedades discriminatorias de tal conjugado. Una región no emparejada dentro de un dúplex tendrá como resultado cambios en la forma del surco menor en las proximidades de la base o de las bases desparejadas. Dado que los MBs se adaptan mejor dentro del surco menor de un dúplex de DNA perfectamente coincidente, las disparidades que tienen por resultado cambios de forma en el surco menor reducirían la fuerza de la unión de surco menor de un MB a una región que contiene una disparidad. Por lo tanto, la capacidad de un MB para estabilizar tal híbrido se reduciría, aumentando de esta forma la capacidad de un conjugado MB oligonucleótido para discriminar una disparidad a partir de un dúplex perfectamente coincidente. Por otra parte, si una disparidad está fuera de la región complementaria a un conjugado MB oligonucleótido, es de esperar que la capacidad discriminante para oligonucleótidos no conjugados y conjugados con MB sea aproximadamente la misma. Como la capacidad de una sonda de oligonucleótido para discriminar disparidades en parejas de bases simples depende de su longitud, los oligonucleótidos más cortos son más eficaces en discriminar disparidades. La principal ventaja del uso de conjugados de MB oligonucleótidos en este contexto estriba en el hecho de que pueden usarse oligonucleótidos mucho más cortos en comparación con los usados anteriormente (esto es, 20-meros o más cortos) que tienen mayor potencia discriminatoria, debido al pronunciado efecto estabilizante de la conjugación con MGB.

25 En un grupo de realizaciones, el MB se elige entre el grupo consistente en análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas.

Otros ligandos del surco menor preferidos son los elegidos entre las fórmulas:



30 el subíndice m es un número entero de 2 a 5; el subíndice r es un número entero de 2 a 10; y cada uno de los grupos R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> es independientemente un grupo de enlace al oligonucleótido (bien sea directamente o indirectamente a través de un apagador), H, —OR<sup>c</sup>, —NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, —COOR<sup>c</sup> o —CONR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, en donde cada R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> se elige entre H, heteroalquilo (C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>), heteroalqueno (C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>), heteroalquino (C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>), alquilo (C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>), alqueno (C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>), alquino (C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>), aril alquilo (C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>) y arilo, con la condición de que uno de los grupos R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> representa un grupo de enlace a ODN, FI o Q.

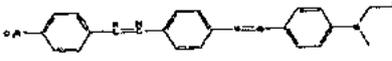
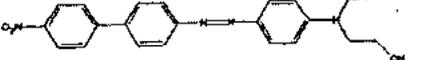
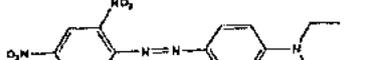
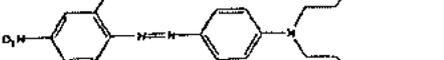
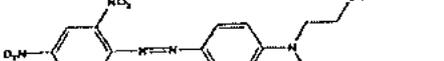
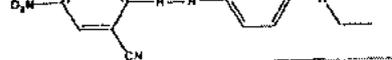
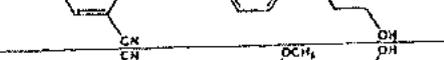
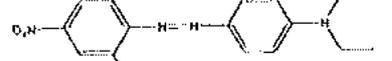
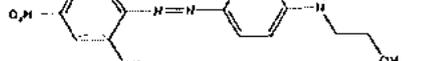
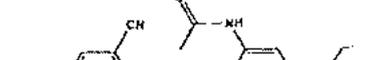
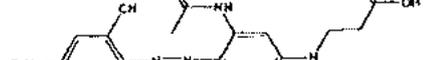
35 Entre los ligandos del surco menor particularmente preferidos se incluyen el trímero de 3-carbamoyl-1,2-dihidro-(3H)-pirrolo[3,2-e]indol-7-carboxilato (CDPI<sub>3</sub>), el pentámero de N-metilpirrol-4-carbox-2-amida (MPC<sub>5</sub>) y otros ligandos del surco menor que muestran una discriminación de disparidad aumentada. Otros restos MG que van a encontrar empleo en la práctica de la presente invención se describen en la patente de EE.UU. nº 5.801.155 en común con la presente. En ciertas realizaciones, los MBs pueden tener unidos grupos potenciadores de la solubilidad en agua (p. ej. azúcares, aminoácidos, sustituyentes de ácido carboxílico o ácido sulfónico, y similares). Véase el documento PCT/US03/07467. Los conjugados de dihidrociclopirroloindol tripéptido (DPI<sub>3</sub>) y oligonucleótidos son comercializados por Epoch Biosciences como MGB Eclipse Sonda Systems. MGB™ es una marca comercial de Epoch Biosciences (Bothell, WA).

Apagadores

45 Los métodos de detección recientemente desarrollados emplean el proceso de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para la detección de la hibridación de la sonda en vez de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, la FRET tiene lugar entre un fluoróforo donador (*reporter* o informador) y una molécula de aceptor (apagador) cuando el espectro de absorción de la molécula de apagador se solapa con el espectro de emisión de fluoróforo donador y las dos moléculas están en estrecha proximidad. La energía del estado excitado del fluoróforo donador es transferida al aceptor próximo por una interacción de resonancia de dipolo - dipolo inducido, lo que tiene por resultado el apagado de la fluorescencia del donador. Si la molécula de aceptor es un fluoróforo, su fluorescencia puede aumentarse algunas veces. La eficiencia de la transferencia de energía entre las moléculas de aceptor y donador depende en gran medida de la distancia entre las moléculas. Se conocen ecuaciones que describen estas relaciones. La distancia de Forster (R<sub>0</sub>) se describe como la distancia entre las moléculas

de donador y aceptor en la que la transferencia de energía es eficiente en un 50%. También se conocen otros mecanismos de apagado de la fluorescencia, tales como el apagado de la transferencia de carga y colisional. Hay en la técnica amplias instrucciones para elegir las parejas de apagador y fluoróforo y su unión a oligonucleótidos (Haugland, R. P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sexta Edición, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996; patentes de EE.UU. nº 3.996.345 y 4.351.760 y similares). Los apagadores preferidos se describen en la patente de EE.UU. nº 6.727.356. Más en particular, la Tabla 1 que sigue a continuación contiene estructuras de apagadores que pueden ser fácilmente modificadas para dar estructuras que tienen grupos funcionales adecuados (p. ej. FI<sup>A</sup>-W en donde FI<sup>A</sup> es un apagador, con sitios de unión para porciones ODN y MB) para la introducción en sondas, basándose en las reacciones químicas conocidas citadas (véanse, por ejemplo, Thiel, et al., *J. für prakt. Chemie*, 328: 497 - 514 (1986); patentes de EE.UU. nº 4.324.721 y 4.054.560; Timm, *Melliand Textilberichte*, 9: 1090 - 1096 (1969); Hallas, *J. S. D. C.* 285 - 294 (1979); Beyer, et al., *J Prakt. Chem.*, 24: 100 - 104 (1964); Hutchings, et al., *Chem. Europ. J.* 3: 1719 - 1727 (1997) y Morley, et al., *J. Phys. Chem. A.*, 102: 5802 - 5808 (1998); Haak, et al., *J. Chem. Res. Miniprint* 10: 2701 - 2735 (1998) y Ruggli et al., *Helv. Chim. Acta*, 26: 814 - 826 (1943). Pueden prepararse estructuras adicionales (p. ej. colorantes mono- y bis-azo) con diferentes combinaciones de sustituyentes en diversas posiciones basándose en compuestos y métodos conocidos en el campo de la química de colorantes (resumido en el Color Index, Issue 3 en CDD-ROM, páginas 4009 a 4324; Society of Dyers and Colourists, Bradford, Inglaterra; <http://www.sdc.org.uk>; y véase también el documento WO 01/86001).

Tabla 1

Literatura estructura	$\lambda_{max}$ nm; $\epsilon$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ; Disolvente	Estructura modif. enlazador Q-W
	464	
	440	
	540; 40,000 MeOH	
	549 37,000 EtOH	
	590 48,978 CHCl <sub>3</sub>	
	601 40,738 CHCl <sub>3</sub>	
	623 48,000 CHCl <sub>3</sub>	
	656 100,000 CHCl <sub>3</sub>	
	656 53,043	

	598	
	582	
	652	
	554 50,000	
	673.5	
	809	
	592 46,000	
	601 51,000	
	623 48,000	
	632 Predicted	

5 Los apagadores anteriores cubren el margen de aproximadamente 400 a 800 nm, y muchos demuestran un apagado mejorado cuando se unen a un MB. Aunque las versiones modificadas ilustran  $-N(CH_2CH_2OH)_2$  como grupo de unión preferido a usar para acoplar el apagador a oligonucleótidos, MB o soporte sólido, en la técnica se conocen ejemplos de otros enlazadores adecuados o se proporcionan en la presente invención.

Los apagadores preferidos para cada uno de los aspectos de la presente invención son elegidos entre aquellos que están en la tabla anterior, así como apagadores bis azo de Biosearch Technologies, Inc. (proporcionados como Apagadores Black Hole™: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcyl, TAMRA y carboxitetrametil rodamina.

#### Fluoróforos

10 Los fluoróforos útiles en la presente invención son generalmente colorantes orgánicos fluorescentes que han sido derivatizados para la unión a la posición terminal 3' o 5' de la sonda de oligonucleótido, preferentemente por medio

de un grupo enlazador. Un experto en la técnica apreciará que los fluoróforos adecuados se eligen en combinación con un apagador que también es típicamente un colorante orgánico, que puede o no ser fluorescente.

Hay abundantes instrucciones prácticas disponibles en la literatura para seleccionar pares adecuados de fluoróforo-apagador para sondas particulares. Véanse, por ejemplo, Clegg (citado anteriormente); Wu et al. (citado anteriormente); Pesce et al., editores, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); y similares. La bibliografía incluye también referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas (apagado) y sus propiedades ópticas relevantes para la elección de pares de fluoróforo-apagador, p. ej. Beriman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ª EDICION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, THE HANDBOOK A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES (Invitrogen, Eugene, Ore. 2005); Pringsheim, FLUORESCENCE AND FOSFORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); y similares. Adicionalmente, también son bien conocidos métodos para la derivatización de fluoróforos y apagadores para la unión covalente por medio de grupos reactivos comunes. Véanse, por ejemplo, Haugland (citado anteriormente); Ullman et al., patente de EE.UU. nº 3.996.345; Khanna et al., patente de EE.UU. nº 4.351.760; y similares.

Son fluoróforos preferidos aquellos que están basados en colorantes de xanteno, varios de los cuales están disponibles comercialmente con sustituyentes útiles para la unión de un grupo de enlace o bien para la unión directa a un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en posición  $\alpha$  o  $\beta$ . Entre tales compuestos naftilamino están 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato y 2-p-toluidinil-6-naftaleno sulfonato. Otros colorantes incluyen 3-fenil-7-isocianato cumarina, acridinas tales como 9-isotiocianato acridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares. Hay aún otros fluoróforos adecuados entre los que se incluyen los colorantes de resorufina, colorantes de rodamina, colorantes de cianina y colorantes de BODIPY.

Estos colorantes y las metodologías de unión apropiadas para la unión a los oligonucleótidos se describen en muchas referencias, p. ej. Khanna et al. (citado anteriormente); Marshall, *Histochemical J.*, 7: 299 - 303 (1975); Menchen et al., patente de EE.UU. nº 5.188.934; Menchen et al., patente europea EPO 272007; y Bergot et al., documento WO 9105060.

Más en particular, los fluoróforos descritos en el presente texto pueden ser unidos a las porciones de oligonucleótido usando, por ejemplo, métodos químicos o enzimáticos. A título de ejemplo, los métodos para la incorporación de grupos químicos reactivos a oligonucleótidos, en sitios específicos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los oligonucleótidos que contienen un grupo químico reactivo, situado en un sitio específico, pueden combinarse con un marcador unido a un grupo reactivo complementario (p. ej. un oligonucleótido que contiene un grupo reactivo nucleofílico puede hacerse reaccionar con un marcador fijado a un grupo reactivo electrofílico) para acoplar un marcador a una sonda por técnicas químicas. Marcadores y métodos ejemplares para la unión de un marcador a un oligonucleótido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.824.796; patente de EE.UU. nº 5.210.015; Kessler (ed.), *Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules*, Springer-Verlag, Berlin, 1992; Kricka (ed.) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, San Diego, 1992; Howard (ed.) *Methods in Nonradioactive Detection*, Appleton & Lange, Norwalk, 1993. El marcaje químico no específico de un oligonucleótido puede conseguirse combinando el oligonucleótido con una sustancia química que reacciona, por ejemplo, con un grupo funcional particular de una base de nucleótido, y simultáneamente o subsiguientemente haciendo reaccionar el oligonucleótido con un marcador. Véase, por ejemplo, Draper et al. (1980) *Biochemistry* 19: 1774 - 1781. La incorporación enzimática de marcador en un oligonucleótido puede conseguirse realizando la modificación enzimática o la polimerización de un oligonucleótido usando precursores marcados, o añadiendo enzimáticamente marcador a un oligonucleótido ya existente. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.449.767. Los ejemplos de enzimas modificadores incluyen, pero sin limitarse a ellas, DNA polimerasas, transcriptasas inversas, RNA polimerasas, etc. Los ejemplos de enzimas que pueden añadir un marcador a un oligonucleótido ya existente incluyen, pero sin limitarse a ellas, quinasas, transferasas terminales, ligasas, glicosilasas, etc.

Para cada uno de los aspectos de la presente invención, se eligen los fluoróforos preferidos entre cianinas, análogos de BODIPY, 5-FAM, 6-FAM, TET™, JOE™, HEX™, VIC™, NED™, TAMRA™, ROX™, Bothell Blue™ y Yakima Yellow™ (YY). Estos fluoróforos son generalmente disponibles de fuentes comerciales tales como Applied Biosystems Inc., Foster City, CA. y Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WA.

Se han descrito métodos homogéneos para la detección de ácido nucleico amplificado con reactivos de unión de ácido nucleico (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.994.056 y 6.171.785; y Bengtsson et al. *Nucl. Acids Res.*, 31: e45 (2003)). Se ha usado CYBR® Green I, un agente de unión de DNA, para controlar la amplificación (patente de EE.UU. nº 6.569.627). Hay colorantes de unión nucleica comercialmente disponibles de, por ejemplo, Invitrogen (Eugene, OR; <http://sondas.invitrogen.com>).

Grupos de enlace.

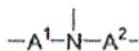
Hay una diversidad de grupos y métodos de enlace que son conocidos por los expertos en la técnica para la unión de fluoróforos, apagadores y ligandos del surco menor a los términos 5' o 3' de los oligonucleótidos. Véanse, por ejemplo, Eckstein, editor, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGS: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., *Nucleic Acid Research*, 15: 5305 - 5321 (1987); Sharma et al., *Nucleic Acid Research*, 19: 3019 (1991); Giusti et al., *PCR Methods and Applications*, 2: 223 - 227 (1993), Fung et al., patente de EE.UU. n° 4.757.141; Stabinsky, patente de EE.UU. n° 4.739.044; Agrawal et al., *Tetrahedron Letters*, 31: 1543 - 1546 (1990); Sproat et al., *Nucleic Acid Research*, 15: 4837 (1987); Nelson et al., *Nucleic Acid Research*, 17: 7187 - 7194 (1989); y similares. Pueden ser usados otros grupos de enlace disponibles comercialmente que pueden unirse a un oligonucleótido durante la síntesis, p. ej. disponibles de Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.). Otras metodologías para la unión de un fluoróforo a una porción de oligonucleótido implican el uso de química de fosforamidita a la conclusión de la síntesis en fase sólida por medio de colorantes derivatizados con un resto de fosforamidita. Véanse, por ejemplo, Woo et al., patente de EE.UU. n° 5.231.191; Hobbs, Jr., patente de EE.UU. n° 4.997.928; Reed, et al., publicación PCT No. WO 01/42505; documento WO 02/099141, patente de EE.UU. n° 6.653.473; documento WO 03/023357.

Aunque hay disponibles varios métodos generales de enlace, la selección de ciertos grupos de enlace constituye un aspecto de la presente invención, cuando la selección se hace en combinación con otros factores tales como la longitud del oligonucleótido, ligandos del surco menor, pares de fluoróforo-apagador, y similares. Por ejemplo, en la presente invención el uso de ligandos del surco menor permite la preparación de sondas que tienen menos bases de nucleótido. En general, las sondas que tienen menos de aproximadamente 15 bases han sido consideradas no utilizables debido a la escasa señalización y/o hibridación con los polinucleótidos diana. Adicionalmente, se han evitado las sondas más pequeñas (p. ej. las de 15 bases o menos) para ensayos de baliza ya que el apagador/fluoróforo frecuentemente no están suficientemente separados para proporcionar una señal adecuada al tener lugar la hibridación.

En la presente invención, se ha encontrado que son de utilidad sondas más cortas que tienen unidos ligandos del surco menor, y puede obtenerse un espaciado suficiente entre el fluoróforo y el apagador mediante la selección de un grupo de enlace apropiado. Las sondas y conjugados tendrán generalmente uno o dos tipos de grupos de enlace. Como se establece en la fórmula I, la letra K representa un grupo de enlace divalente, mientras que la letra W representa un grupo de enlace trivalente. Los grupos de enlace particulares se eligen generalmente por su facilidad de síntesis, utilidad en la síntesis en fase sólida, estabilidad durante la construcción y el uso de la sonda, y los parámetros físicos que cada uno confiere a la sonda o conjugado, tal como proporcionar la adecuada separación entre el fluoróforo y el apagador; o proporcionar una atadura de longitud adecuada para permitir que la porción del ligando del surco menor interaccione no covalentemente con el surco menor formado al tener lugar la hibridación de la sonda.

Más en particular, K es un enlace directo entre un fluoróforo y la porción de oligonucleótido de la sonda/conjugado, o es un grupo de enlace divalente que tiene de 1 a 50 átomos de la cadena principal que se eligen entre C, O, N, S, P y Si.

El grupo de enlace trivalente W puede abarcar una diversidad de estructuras con el fin de proporcionar una unión y una flexibilidad adecuadas entre ODN, Q y MGB. En un grupo de realizaciones, W es una funcionalidad trivalente que tiene la fórmula:



en la que el átomo de nitrógeno está unido directamente a un anillo aromático de un colorante mono azo- o bis azo (apagador, Q) y típicamente está considerado como parte del apagador, y los componentes A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> se eligen independientemente entre un enlace o una porción enlazador/espaciador que tiene de 1 a aproximadamente 50 átomos elegidos entre C, N, S, P, Si y O, y átomos de hidrógeno adicionales para llenar las valencias disponibles. Adicionalmente, cada uno de los grupos A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> puede tener componentes cíclicos, componentes acíclicos (lineales o ramificados), o una combinación de los mismos.

#### Métodos de uso.

El método de la presente invención en el que el solapamiento de las secuencias de la sonda y del cebador se solapan proporciona ventajas sobre los métodos existentes, entre las que se incluye una expansión de las oportunidades de diseño del cebador y la sonda, especialmente en entornos de secuencias "challenging". El método de la presente invención es particularmente útil realizado en tiempo real con un proceso de amplificación tal como, por ejemplo, la PCR. El método de la presente invención puede llevarse a cabo en una diversidad de formatos entre los que se incluyen, pero sin limitarse a ellos, un formato basado en la detección de la hibridación, un formato en el que la sonda es segmentada ("clivada") por la actividad de 5'-nucleasa, o en un formato independiente de la sonda, en el que los cebadores se superponen y se usa un colorante específico para ácido nucleico bicatenario, para detectar la diana amplificada.

Las secuencias de sonda y cebador son sustancialmente solapadas entre 1 y 7 bases.

En los métodos de la presente invención, el solapamiento de las secuencias de sonda y cebador es útil en técnicas en las que está implicada la hibridación de una sonda de oligonucleótido con otro ácido nucleico. Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana es el punto final; técnicas en las que la hibridación de uno o más oligonucleótidos con un ácido nucleico diana precede a una o más etapas de alargamiento mediado por polimerasa que usa el oligonucleótido como cebador y el ácido nucleico diana como plantilla; técnicas en las que se usa la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana para bloquear la extensión de otro cebador; y técnicas en las que dos o más oligonucleótidos son hibridados con un ácido nucleico diana y se miden las interacciones entre los múltiples oligonucleótidos. Las condiciones para la hibridación de oligonucleótidos, y los factores que influyen en el grado y la especificidad de la hibridación, tales como la temperatura, la fuerza iónica y la composición del disolvente, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., supra; Ausubel, et al., supra; M. A. Innis et al. (eds.) PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 1990; B. D. Hames et al. (eds.) Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 5143 - 5151. Hay aún otros métodos en los que pueden usarse múltiples sondas para detectar regiones alternativas del sitio diana (p. ej. para identificar secuencias difíciles o para diferenciar especies y subespecies de la diana).

La hibridación de sondas y/o cebadores con secuencias diana procede de acuerdo con las propiedades del emparejamiento de bases bien conocido por los expertos en la técnica, tal como emparejar bases de adenina con timina o uracilo, y emparejar bases de guanina con citosina. La propiedad de un nucleótido que le permite emparejar bases con un segundo nucleótido se llama complementariedad. Además, la adenina es complementaria tanto con la timina como con el uracilo, y viceversa; del mismo modo, la guanina es complementaria con la citosina y viceversa. Se dice que un oligonucleótido que es complementario a lo largo de toda su longitud con una secuencia diana es perfectamente complementario, perfectamente coincidente, o completamente complementario con la secuencia diana, y viceversa. Se dice que un oligonucleótido y su secuencia diana pueden tener secuencias relacionadas, en las que la mayoría de las bases en las dos secuencias son complementarias, pero una o más bases son no complementarias, o dispares. En tal caso, se puede decir que las secuencias son sustancialmente complementarias entre sí. Si las secuencias de un oligonucleótido y una secuencia diana son tales que son complementarias en todas las posiciones de los nucleótidos excepto en una, el oligonucleótido y la secuencia diana tienen una disparidad de un solo nucleótido entre sí.

Las sondas señal basadas en la hibridación son bien conocidas en la técnica e incluyen balizas moleculares (*molecular beacons*) (patente de EE.UU. nº 6.037.130), balizas de ácido nucleico peptídico (patente de EE.UU. nº 6.355.421) y sondas 5'-ligando del surco menor, (documento WO03/062445, patente de EE.UU. nº 6.472.153, y documento U.S. 2005/ 0214797) y sondas de transferencia de energía fluorescente (véanse las patentes de EE.UU. nº 6.911.310 y nº 6.174.670). Los cebadores *self-reporting* (auto-informadores) incluyen cebadores auto-apagados (Nazerenko et al, *Nucl. Acids Res.*, 30: e37 (2002)), cebadores scorpion dúplex (Solinas et al, *Nucl. Acids Res.*, 29: e96 (2001)), cebadores Sunrise (Nazarenko et al. *Nucl. Acids Res.*, 25: 2516-2521 (1997)) y cebadores PNA/DNA (Fiandaca et al, *Genome Res.*, 11: 609 - 13 (2001)).

Para los cebadores y sondas usados en el método de la presente invención que incorporan bases modificadas, se entiende que las bases modificadas retendrán la especificidad del emparejamiento de bases de sus análogos naturales. Por ejemplo, los análogos de PPPG son complementarios con la citosina, mientras que los análogos de PPPA son complementarios con la timina y el uracilo. Los análogos de PPPG y PPPA no solo tienen una tendencia reducida por el llamado emparejamiento "wobble" o de bamboleo con bases no complementarias, en comparación con la guanina y la adenina, sino que los grupos 3-sustituidos aumentan la afinidad de la unión en los dúplexes. Del mismo modo, las pirimidinas modificadas se hibridan específicamente con sus contrapartidas de origen natural.

Las condiciones para la hibridación son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden variarse dentro de límites relativamente amplios. La estringencia de la hibridación se refiere al grado hasta el cual las condiciones de hibridación desfavorecen la formación de híbridos que contienen nucleótidos dispares, promocionando así la formación de híbridos perfectamente coincidentes o híbridos que contienen pocas disparidades; con estringencia más alta correlacionada con una tolerancia más baja para híbridos dispares. Los factores que afectan la estringencia de la hibridación incluyen, pero sin limitarse a ellos, la temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de disolventes orgánicos tales como formamida y dimetilsulfóxido y caótropos.

Así pues, en la formación de híbridos (dúplexes) entre una sonda/conjugado y su secuencia diana, la sonda/conjugado se incuba en solución, junto con un polinucleótido que contiene la secuencia diana, bajo condiciones de temperatura, fuerza iónica, pH, etc, que sean favorables a la hibridación, es decir, bajo condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se eligen, en algunas circunstancias, para favorecer la hibridación entre dos ácidos nucleicos que tienen secuencias perfectamente coincidentes, en comparación con una pareja de ácidos nucleicos que tienen una o más disparidades en la secuencia de hibridación. En otras circunstancias, las condiciones de hibridación se eligen para evitar la hibridación entre secuencias dispares, favoreciendo la hibridación entre ácidos nucleicos que tienen menos disparidades.

El grado de hibridación de un oligonucleótido con una secuencia diana, conocido también como fuerza de hibridación, se determina por métodos que son bien conocidos en la técnica. Un método preferido es determinar la  $T_m$  del dúplex híbrido. Esto se realiza, como se describió antes, sometiendo un dúplex en solución a temperaturas gradual-

mente crecientes y controlando la desnaturalización del dúplex, por ejemplo mediante la absorbancia de luz ultravioleta, que aumenta con el desapilamiento de los pares de bases que acompaña a la desnaturalización. La  $T_m$  se define generalmente como el punto medio de temperatura de la transición en la absorbancia del ultravioleta que acompaña a la desnaturalización. Alternativamente, si se conocen las  $T_m$ , puede elegirse una temperatura de hibridación (a unos valores fijados de fuerza iónica, pH y concentración del disolvente) que sea inferior a la  $T_m$  del dúplex deseado y superior a la  $T_m$  de un dúplex no deseado. En este caso, la determinación del grado de hibridación se realiza simplemente ensayando la presencia de sonda hibridada.

Comúnmente se usan ensayos de extensión del cebador para el tipaje de SNP y también pueden usarse en otras aplicaciones de genotipaje y cribado de mutaciones (Pastinen T. et al., *Genome Res.*, 10: 1031 - 42 (2000)). En la presente invención, la presencia de ligandos del surco menor y, en algunos casos, bases modificadas, puede mejorar los ensayos de extensión del cebador. Por ejemplo, la estabilidad añadida del dúplex, proporcionada por MB, o pirimidina 5-sustituida o pirazolo[3,4-d]pirimidina 3- sustituida, permite que se realicen extensiones a temperaturas elevadas. Esto es una ventaja por cuanto a temperaturas elevadas pueden eliminarse estructuras secundarias problemáticas en moléculas diana. También, la hibridación de la diana con el cebador es más rápida a temperatura elevada. En tales reacciones pueden usarse polimerasas termoestables tales como polimerasa Taq y DNA polimerasa Bst. Aunque los MBs y bases modificadas pueden proporcionar sondas y cebadores tienen los inconvenientes indicado anteriormente, el uso de una base modificada será típicamente en una posición distinta de la posición 3'-terminal con el fin de evitar la inhibición de la extensión del cebador.

Además, los MBs y las bases modificadas mejoran la especificidad de los ensayos eliminando una clase de señales positivas falsas. Las secuencias de cebador que forman estructuras en horquilla u homodímeros son propensas a la extensión independiente de la plantilla (el extremo 5' del cebador funciona como plantilla), teniendo como resultado una señal positiva falsa. Los MBs y bases modificadas en "plantillas" inhiben la extensión por DNA polimerasas. Así pues, los MBs en el extremo 5', o las bases modificadas en el extremo 5' o la mitad de un cebador, pueden prevenir la extensión (falsos positivos) a partir de horquillas de cebador o dímeros de cebador. Finalmente, puede usarse PPG para eliminar estructuras no canónicas formadas por oligonucleótidos ricos en G, que permiten ensayos de extensión del cebador en tales secuencias.

Otros ensayos en los que los presentes oligonucleótidos modificados son útiles en particular se describen en la patente de EE.UU. nº 6.312.894.

Teniendo en cuenta lo que antecede, la presente invención proporciona un método para el control continuo de la amplificación de polinucleótidos, que comprende:

(a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana, con uno o más cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un conjugado de oligonucleótido que tiene la formula:



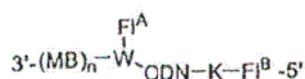
en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace, en donde la secuencia de ODN solapa de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos uno de dichos cebadores y la porción de ODN tiene una secuencia complementaria con una porción de la secuencia diana que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

(b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización; y

(c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la hibridación del conjugado con la diana amplificada.

La presente invención proporciona también un método alternativo para controlar en continuo la amplificación del polinucleótido, que comprende:

(a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana con uno o más cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un conjugado de oligonucleótido que tiene la formula:



en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido

modificado, K es una unión o un grupo de enlace, la secuencia de ODN que tiene un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos uno de dichos cebadores y la porción de ODN tiene una secuencia complementaria a una porción de la secuencia diana que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

5 (b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa con actividad de 5'-nucleasa; y

(c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la hibridación del conjugado con la diana amplificada y la segmentación o clivaje mediante la actividad de 5'-nucleasa.

También se menciona un segundo método alternativo para el control continuo de la amplificación de un polinucleótido, que comprende:

10 (a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana con dos cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un colorante de unión de ácido nucleico bicatenario, en donde la secuencia del primer cebador solapa de 1 a 7 bases con la secuencia del segundo cebador, para proporcionar una mezcla;

(b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización; y

15 (c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la unión del colorante con la diana amplificada.

En una realización relacionada, la presente invención proporciona un método para el control continuo de la amplificación de un polinucleótido, que comprende:

20 a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana con dos cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula:



25 en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace, en donde la secuencia de ODN solapa de 1 a 7 bases con las secuencias de ambos cebadores y la porción de ODN tiene una secuencia complementaria a una porción de la secuencia diana que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

(b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización; y

30 (c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la hibridación del conjugado con la diana amplificada.

En un método alternativo, la fluorescencia se mide después de terminar la amplificación, este tipo de método es conocido como método de análisis de punto final.

35 Los procedimientos de amplificación son aquellos en los que se generan muchas copias de una secuencia de ácido nucleico diana, normalmente de una forma exponencial, mediante polimerización secuencial. Muchas reacciones de amplificación, tales como la PCR, utilizan reacciones reiterativas de polimerización dependientes del cebador. Un cebador es un ácido nucleico que es capaz de hibridarse con un segundo ácido nucleico plantilla y que, una vez hibridado, es capaz de extenderse mediante una enzima de polimerización (en presencia de sustratos de nucleótido), usando el segundo ácido nucleico como plantilla. Las enzimas de polimerización incluyen, pero sin limitarse a ellas, DNA y RNA polimerasas y transcriptasas inversas, etc. Las condiciones favorables para la polimerización mediante diferentes enzimas de polimerización son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., supra; Ausubel, et al., supra; Innis et al., supra. Generalmente, para que pueda ser extendible mediante una enzima de polimerización, un cebador ha de tener un extremo 3' no bloqueado, preferentemente un grupo 3' hidroxilo libre. El producto de una reacción de amplificación es un cebador extendido, en donde el cebador ha sido extendido por una enzima de polimerización.

45 Así pues, en una realización preferida de la invención, los métodos descritos y reivindicados en el presente texto son útiles en la mejora y el control de las reacciones de amplificación tales como la PCR. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 4.683.202, 4.683.195 y 4.800.159; Mullis y Faloona, supra; y Saiki et al., supra. Lo más frecuente es que la etapa de polimerización de la PCR sea catalizada por una enzima de polimerización termoestable, tal como una DNA polimerasa aislada de una bacteria termófila, a causa de las elevadas temperaturas requeridas para la etapa de desnaturalización de la PCR.

50

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para detectar una secuencia diana en un polinucleótido, en el que el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en donde uno o más de los otros polinucleótidos de la mezcla comprenden secuencias que están relacionadas pero que no son idénticas a la secuencia diana, comprendiendo el método:

- 5 (a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula:



10 en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un fluoróforo y el otro de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace; la secuencia de ODN que tiene un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos un cebador de amplificación de la secuencia diana y el ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia diana que es perfectamente complementaria para la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con ninguno de los otros polinucleótidos; y

- 15 (b) medir la fluorescencia producida en la formación del híbrido, con lo que la formación del híbrido indica la presencia de dicha secuencia diana.

Preferentemente, al menos uno de los otros polinucleótidos tiene una secuencia diana (una secuencia relacionada) con una o más disparidades de bases, más preferentemente de una a tres disparidades, y lo más preferentemente solamente una disparidad de bases.

20 También se menciona un método alternativo para detectar una secuencia diana en un polinucleótido, en el que el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en el que uno o más de los otros polinucleótidos de la mezcla comprenden secuencias que están relacionadas pero no son idénticas a la secuencia diana (p. ej., que tiene de una a tres disparidades, preferentemente una o dos disparidades), comprendiendo el método:

25 (a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con dos oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados del cebador, teniendo las secuencias de oligonucleótido u oligonucleótido modificado un solapamiento de 1 a 7 bases entre sí y el oligonucleótido o el oligonucleótido modificado forma híbridos estables solamente con dicha secuencia diana que es perfectamente complementaria con la porción de ODN de dicho cebador, y el cebador no forma un híbrido estable con ninguno de los otros polinucleótidos; y

(b) medir la fluorescencia que se produce al tener lugar la unión de un colorante de unión de ácido nucleico a la diana amplificada, con lo que el colorante de unión indica la presencia de dicha secuencia diana.

30 Como se señaló anteriormente, una secuencia diana se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de hibridación para una sonda o un cebador. Las secuencias diana pueden encontrarse en cualquier ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a ellos, DNA, cDNA, RNA genómicos y cualquier producto amplificado de los mismos, y puede comprender una secuencia génica de tipo silvestre, una secuencia génica mutante, una secuencia no codificadora, una secuencia reguladora, etc. Una secuencia diana será generalmente de menos de 100 nucleótidos, preferentemente menos de 40 nucleótidos, y lo más preferentemente, menos de 21 nucleótidos de longitud.

35 Los conjugados usados en este aspecto de la invención son esencialmente los mismos que los que han sido descritos en el presente texto y los polinucleótidos pueden distinguirse determinando qué polinucleótidos se hibridan con el conjugado de oligonucleótido. Las condiciones para la hibridación de conjugados o sondas de oligonucleótido son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra; Innis et al., supra; Hames et al., supra; y van Ness et al., supra.

40 La hibridación puede ser ensayada (es decir, los ácidos nucleicos hibridados pueden ser identificados) distinguiendo la sonda hibridada de la sonda libre por uno de los varios métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, la unión del ácido nucleico diana a un soporte sólido, bien sea directa o indirectamente (por hibridación con una segunda sonda unida al soporte o interacción entre ligandos unidos a la superficie y conjugados con la sonda) seguida por la hibridación directa o indirecta con la sonda, y lavado para eliminar la sonda no hibridada; determinación de resistencia a la nucleasa; determinación de la densidad de flotación; métodos de afinidad específicos para dúplexes de ácido nucleico (p. ej. cromatografía con hidroxapatita); interacciones entre sondas múltiples hibridadas con el mismo ácido nucleico diana; etc. Véanse, por ejemplo, Falkow et al., patente de EE.UU. n° 4.358.535; Urdea et al., patentes de EE.UU. n° 4.868.105 y 5.124.246; Freifelder, *Physical Biochemistry*, Segunda Edición, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1982; Sambrook, et al., supra; Ausubel et al., supra; Hames et al., supra; y otras referencias relacionadas. La capacidad de estabilización de dúplexes de los conjugados de oligonucleótido descritos en el presente texto hace posible la hibridación bajo condiciones más estrictas, con lo que la estructura secundaria potencialmente oclusiva en el ácido nucleico diana puede ser minimi-

zada. En consecuencia, tales conjugados de oligonucleótido son preferidos en particular en este aspecto de la presente invención.

En un grupo de realizaciones preferidas, el conjugado de oligonucleótido usado en el método de la invención tiene al menos una base pirazolo[3,4-d]pirimidina y/o una base pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituída. En este grupo de realizaciones, el conjugado se hibrida para dar un producto de extensión de una diana, y se efectúa un cambio en el estado físico del par de fluoróforo/apagador como consecuencia de la hibridación.

El uso de cebadores, sondas y conjugados (5'-MB-FI<sup>A</sup>-ODN-FI<sup>B</sup>-3') del método de la presente invención en este y en otros métodos relacionados permite aplicar una mayor velocidad, sensibilidad y poder de discriminación a los ensayos en entornos de secuencia *challenging*. En particular, la mejor capacidad de las sondas y conjugados para permitir la discriminación entre un híbrido perfecto y un híbrido que contiene una disparidad de una sola base facilitará el uso de ensayos de amplificación en tiempo real, por ejemplo en la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido y similares. Un experto en la técnica apreciará que las composiciones y métodos, tales como los de la invención, que son capaces de discriminar disparidades de un único nucleótido serán también capaces de discriminar entre secuencias que tienen 2, 3, 4, 5, o incluso 6 o más disparidades con respecto a la otra.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para distinguir entre polinucleótidos diana de tipo silvestre, mutante y heterocigótico, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido diana con dos sondas en la que una primera sonda es específica para el polinucleótido diana de tipo silvestre y una segunda sonda es específica para el polinucleótido diana mutante, teniendo cada una de las sondas la fórmula:



en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un fluoróforo y el otro de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, teniendo la secuencia de ODN un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos un cebador de amplificación del polinucleótido diana; K es una unión o un grupo de enlace; en donde la primera y la segunda sondas tienen fluoróforos diferentes y cada una de las sondas forma un híbrido estable solamente con la secuencia diana que es perfectamente complementaria con la porción de ODN de la sonda; y

(b) medir la fluorescencia producida en la formación del híbrido, con lo que la formación del híbrido indica la presencia o ausencia de cada uno de los polinucleótidos diana de tipo silvestre, mutante o heterocigótico.

En este aspecto de la invención las temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>) para cada híbrido producido entre la primera y la segunda sondas y sus correspondientes dianas están preferentemente en aproximadamente 5° C del otro. En un grupo de realizaciones preferidas, la porción de ODN de cada una de las sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 8 a 18 bases o bases modificadas, más preferentemente un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 10 a 15 bases o bases modificadas. En otras realizaciones preferidas, las porciones de fluoróforo de cada una de las sondas se eligen entre cianinas, análogos de BODIPY, 5-FAM<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAMRA<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup>, Bothell Blue<sup>TM</sup> y Yakima Yellow<sup>TM</sup> (YY). Estos fluoróforos son disponibles de Applied Biosystems Inc., Foster City, CA y de Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WA.

En otras realizaciones preferidas más, la porción de ODN de cada una de dichas sondas contiene al menos una base modificada. Preferentemente, cada base modificada se elige independientemente entre 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona, 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, 1H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H)-6(7H)-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidina-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidina-2,4-diona, 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina, 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para distinguir entre polinucleótidos diana de tipo silvestre, mutantes y heterocigóticos, comprendiendo el método:

(a) medir la emisión de fluorescencia en función de la temperatura para determinar un primer perfil de fusión de una primera fusión de la sonda a partir de un primer polinucleótido amplificado y un segundo perfil de fusión de una segunda fusión de la sonda a partir de un segundo polinucleótido amplificado; y

(b) comparar la primera curva de fusión con la segunda curva de fusión.

- 5 En otras realizaciones preferidas, la muestra se pone en contacto además con un conjunto de cebadores bajo condiciones de amplificación y cada uno de los cebadores contiene de una a diez bases modificadas elegidas entre el grupo proporcionado anteriormente. En consecuencia, en otro aspecto de la invención, se proporcionan *kits* que contienen sondas/conjugados como se describen antes, junto con cebadores para reacciones de amplificación, en donde los cebadores contienen una o más bases modificadas, más preferentemente, de una a diez bases modificadas por cebador.

10

#### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra el efecto del solapamiento de cebador y sonda con una a 11 pares de bases en un modelo de enterovirus.

#### PCR en tiempo real usando sondas marcadas con MGB Eclipse

- 15 Se realizó la PCR en tiempo real en un sistema de Detección de Secuencias ABI Prism® 7900 (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, CA), (Afonina, I et al., J. Clin. Ligand Assay, Vol. 25, Vol. 23, pp. 268). Se hicieron 50 ciclos de un perfil de PCR en tres etapas (95° C durante 5 s, 56° C durante 20 s y 76° C durante 30 s), después de 2 min iniciales a 95° C. Se usaron 2× Jump Start™ Taq Ready Mix™ disponibles comercialmente para PCR cuantitativa con 5 mM de Mg<sup>2+</sup> de concentración final (Sigma n° D 74403) suplementado con JumpStart Taq Polimerasa (n° de catálogo de Sigma 90 4184) hasta una cantidad final de 0,37 U/μl. La concentración final de las sondas fue 0,2 μM; la concentración de ambos cebadores fue 0,1 μM. Cada 5 μl de reacción contenían 10 ng de plantilla de DNA o cDNA liofilizado en placas de 96 o 384 pocillos con un concentrador centrífugo *speed vac* antes del inicio de la reacción. De forma rutinaria se ensayaron muestras de DNA por triplicado usando una placa de 384 pocillos. Se usó una Biomek® 2000 Laboratory Automation Station (Beckman Coulter, EE.UU.) para establecer las reacciones de PCR.

20

#### Sistema modelo.

Las secuencias del cebador y de la sonda solapada para el ensayo de MGB Eclipse en enterovirus se muestran en la Tabla 2.

<b>Tabla 2. Secuencias de cebador y sonda superpuesta.</b>		
"A" es Super A, ligando MGB es DPI <sub>3</sub> , Q es apagador Eclipse Dark y FI es fluoresceína		
		<b>Secuencia</b>
<b>Cebador directo</b>		GTTAGGA*TTAGCCGCATTC
<b>Cebador inverso</b>		GA*AGA*GTCTATTGA*GCTA
<b>Sonda n°</b>	<b>Solapamiento</b>	
1	1	MGB-Q-AGTAGTCCTCCGGC-F1
2	2	MGB-Q-TCCTCCGGCCCCTG-F1
3	3	MGB-Q-CCTCCGGCCCCTGAA-F1
4	4	MGB-Q-CCTCCGGCCCCTGAAT-F1
5	5	MGB-Q-CTCCGGCCCCTGA A* TG-F1
6	6	MGB-Q-TCCGGCCCCTGAATGC-F1
7	7	MGB-Q-CCGGCCCCTGAATGCG-F1
8	8	MGB-Q-CGGCCCCTGAATGCGG-F1
9	9	MGB-Q-GGCCCCTGAATGCGGC-F1
10	10	MGB-Q-GCCCCTGAATGCGGCT-F1
11	11	MGB-Q-CCCCTG A* ATGCGGCTA-F1

Estas sondas fueron evaluadas en un ensayo MGB Eclipse y los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, todas las sondas con 0 a 7 bases solapadas (nº 1 a 8) con el cebador, mostraron amplificación. La sonda con un solapamiento de 6 bases (nº 7) dio una amplificación similar a la del testigo sin solapamiento. La señal se redujo significativamente con 8 solapamientos (nº 9) mientras que no se obtuvo ninguna señal relacionada con la amplificación con 9 a 11 solapamientos (nº 10 a 12).

Ejemplo 2.

Este ejemplo ilustra la detección del poliovirus BK con un ensayo MGB Eclipse en el que un cebador y una sonda se solapan con una sola base. Sonda y cebadores fueron diseñados contra la secuencia VP1 que codifica poliovirus BK indicada. El solapamiento de una base con el cebador inverso se muestra a continuación.

```

CCAAATAGGCCTTATGGTCAGTATTCATACCTGGGACTGGGCTGTGGGTTTTAGGGGTT
ATAGTACCATCAGGGTACTTTGACCTGTAATTcattagcactccctgcatttccAAGGGTTC
TCCACCTACAGCAAAGaagtggaaattactgccttgaataggTTTTCCCTCCACCATGCTCAT
GCACTTTTTGTGACCCCTGCATGAAGGTTAAGCATGCTAGTTATTCCAATAACCTCTGTTTGT

```

Las secuencias del cebador se muestran en letras minúsculas itálicas en negrita y las secuencias de la sonda en letras mayúsculas en negrita. La base del cebador y sonda superpuesta o solapada se muestra en negrita y subrayada.

En la figura 3 se muestra una titulación del virus BK con el cebador y la sonda solapados, demostrando la eficaz amplificación por PCR.

Ejemplo 3.

Ilustra un solapamiento de cebador y sonda de una sola base usado en un ensayo MGB Eclipse para un polimorfismo MMP3 (metaloproteinasas de matriz 3 (estromelina 1, progelatinasa). Los diseños de la sonda y el cebador se muestran a continuación, en donde "G\*" es Super G. El solapamiento de una sola base fue diseñado entre el cebador inverso y la sonda. Las secuencias de las sondas y cebadores se muestran a continuación.

Cebador directo	GCACCTGGCCTAAAGACATT
Cebador inverso	CCCTGTATTTCAATCAGGACAAGA
Sonda de tipo silvestre	MGB-GG*GAAAAACCATGT-FAM
Sonda mutante	MGB GG*GAAAAACCATGT-TET

La amplificación por PCR se realizó como se describe en el Ejemplo 1 con modificaciones menores: la concentración de Mg<sup>2+</sup> era 2 mM, la temperatura de alineamiento (*annealing*) fue 52° C, y se llevó a cabo una etapa de fusión después de completarse la PCR en un equipo Rotor-Gene 3000 o AB 7900. El genotipaje por curva de fusión post MGB Eclipse PCR del polimorfismo en 102 muestras de DNA se muestra en la Figura 4. Ciento dos muestras de DNA del Centre Etude Polymorphism Humaine (CEPH) (Centro de Estudios del Polimorfismo Humano) no relacionado fueron obtenidas del Coriell Institute of Medical Research (<http://locus.umdj.edu>) después de especificar que las muestras de DNA se iban a usar solamente para investigación.

La Figura 4 indica una eficiente amplificación por PCR y un tipaje satisfactorio de muestras de DNA de tipo silvestre, heterocigótico y mutante. El tipaje se confirmó mediante análisis de curvas de fusión en los dos canales. El tipaje observado concordaba con el tipo de alelo conocido de cada muestra de DNA.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra un caso en el que las dos secuencias de cebadores se solapan con 4 bases cada una de la secuencia de la sonda para un ensayo de Influenza grupo A. Además este ejemplo ilustra también la medida de punto final de la fluorescencia post- amplificación por PCR. Los diseños de sonda y cebador se muestran a continuación:

**Plantilla:** 5' - AATAAATCATAACTCATGGAATGGCT**aaagACAAGACCAAtcct**GTACCTCTGAC - 3'  
 3' - GAGTACCTTACCGATTCTGTCTGGTTAGGACAGTGGAGACTGAAATACTAAATAA - 5'

**Cebador directo:** AATAAATCATAAGTCAGA\*GGTGAC**agga**  $T_m$  67.8°C (65.6°C),  
**Cebador inverso:** AATAAATCATAACTCA\*TGGG**A**\*ATGGCT**aaag**  $T_m$  67.8°C (65.4°C)

**Sonda** MGB-F1-AAAGACAA\*GACCA**Atcct**-Q  $T_m$  70.2°C

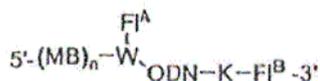
5 En la secuencia plantilla anterior, la secuencia de la sonda se muestra en mayúsculas negritas, mostrándose la secuencia solapada en la sonda en letras minúsculas. Las secuencias del cebador se muestran en itálicas mayúsculas, mostrándose la secuencia solapada en el cebador con la secuencia de la sonda en letra itálica minúscula negrita y la secuencia *flap* subrayada. MGB es el ligando del surco menor, A\* es base Super A, Fl es Gig Harbor Green y Q es el Apagador Eclipse Dark.

10 La RT-PCR se realizó con la mezcla one-step Qiagen, QuantiTect master que contiene MgCl<sub>2</sub> 4 mM a la que se añadió 15,2 U de inhibidor de RNasa Ambión (Austin, Tx) y la concentración final de sonda y cebadores en un volumen de ensayo de 15 µl fueron respectivamente 200 nM y 1 µM. La RT se realizó a 60° C durante 15 min, y la PCR  
 15 15 min a 95° C y después ciclada a 95° C durante 5 segundos, a 56° C durante 20 s y a 76° C durante 15 segundos. La emisión de fluorescencia se midió después de la amplificación por PCR en un sistema de detección de secuencias o secuenciador ABI PRISM® 7900HT (Foster City, CA). Se muestran las relaciones de señal a ruido para una curva de titulación a partir de 1×10<sup>6</sup> a 1×10<sup>0</sup> copias de RNA de Influenza A en la Figura 5. Como se ha indicado las curvas de titulación a partir de 1×10<sup>6</sup> a 1×10<sup>1</sup> copias de RNA de Influenza A indicaron una relación de señal fluorescente a ruido que variaba entre 8,2 y 10. Incluso la dilución 1×10<sup>0</sup> pudo distinguirse del testigo no plantilla (NTC: no template control).

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el control continuo de la amplificación de polinucleótidos, que comprende:

(a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana, con uno o más cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula:



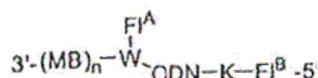
en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace, en donde la secuencia de ODN solapa de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos uno de dichos cebadores y la porción de ODN tiene una secuencia complementaria con una porción de la secuencia diana que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

(b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización; y

(c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la hibridación del conjugado con la diana amplificada.

2. Un método para controlar en continuo la amplificación de polinucleótidos, que comprende:

(a) combinar una muestra que contiene una secuencia diana con uno o más cebadores de oligonucleótido complementarios a regiones de la secuencia diana, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótido, y un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula:



en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace, la secuencia de ODN que tiene un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos uno de dichos cebadores y la porción de ODN tiene una secuencia complementaria a una porción de la secuencia diana que se está amplificando, para proporcionar una mezcla;

(b) incubar la mezcla bajo condiciones favorables para la polimerización con una polimerasa con actividad de 5'-nucleasa; y

(c) controlar en continuo la amplificación controlando la fluorescencia producida al tener lugar la hibridación del conjugado con la diana amplificada y la segmentación mediante la actividad de 5'-nucleasa.

3. Un método para detectar una secuencia diana en un polinucleótido, en el que el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en el que uno o más de los otros polinucleótidos de la mezcla comprenden secuencias que están relacionadas pero que no son idénticas a la secuencia diana, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula:



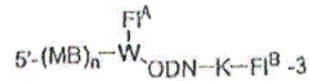
en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un fluoróforo y el otro de los grupos  $FI^A$  y  $FI^B$  es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace; teniendo la secuencia de ODN un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos uno de los cebadores de amplificación de la secuencia diana, en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia diana que es perfectamente complementaria para la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con ninguno de los otros polinucleótidos; y

(b) medir la fluorescencia producida en la formación del híbrido, con lo que la formación del híbrido indica la presencia de dicha secuencia diana.

4. Un método para detectar entre polinucleótidos de tipo silvestre, mutantes y heterocigóticos, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido diana con dos sondas en las que una primera sonda es específica para el polinucleótido diana de tipo silvestre y una segunda sonda es específica para el polinucleótido diana mutante, teniendo cada una de las sondas la fórmula:

5



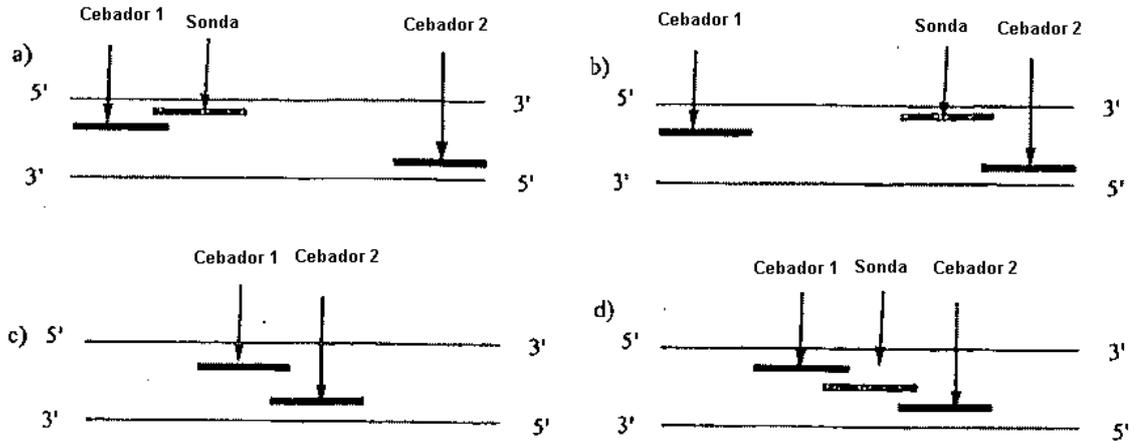
en la que MB es un ligando del surco menor, n es 0 o 1, uno de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un fluoróforo y el otro de los grupos FI<sup>A</sup> y FI<sup>B</sup> es un apagador, W es un grupo de enlace trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es una unión o un grupo de enlace; teniendo la secuencia de ODN un solapamiento de 1 a 7 bases con una secuencia de cebador de al menos un cebador de amplificación del polinucleótido diana; en donde la primera y la segunda sondas tienen fluoróforos diferentes y cada una de las sondas forma un híbrido estable solamente con la secuencia diana que es perfectamente complementaria con la porción de ODN de la sonda; y

10

(b) medir la fluorescencia producida en la formación del híbrido, con lo que la formación del híbrido indica la presencia o ausencia de cada uno de los polinucleótidos diana de tipo silvestre, mutante y heterocigótico.

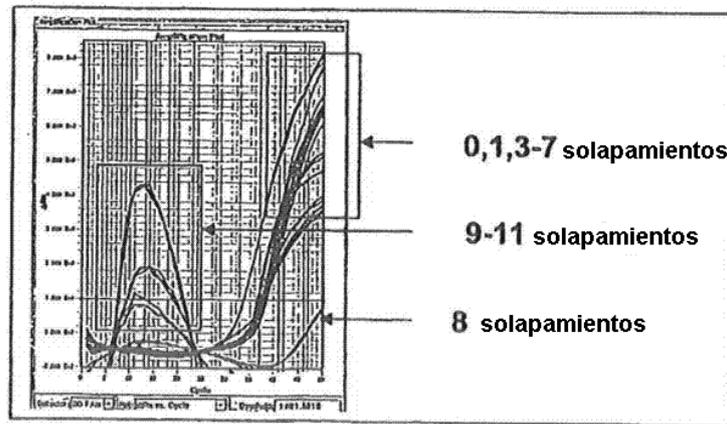
15

Figura 1



5 Figura 1: a) y b) muestran una representación esquemática de la situación de cebador y sonda en la diana, con una secuencia de cebador solapada con una secuencia de sonda; c) muestra una representación esquemática de dos secuencias de cebador solapadas; d) muestra una representación esquemática de una secuencia de sonda solapada con ambos cebadores.

Figura 2



10

Figura 2: Los cebadores y sondas con secuencias solapadas que se muestran en la Tabla I fueron usados en el ensayo MGB Eclipse.

Figura 3

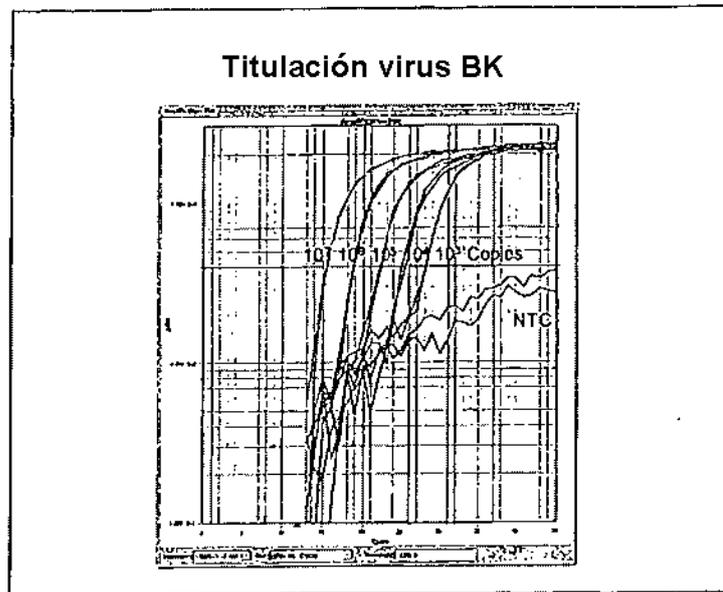


Figura 3. Una titulación por amplificación por PCR de virus BK a partir de  $10^3$  a  $10^7$  copias. Se usaron las condiciones estándar del ensayo con sonda MGB Eclipse.

5

Figura 4

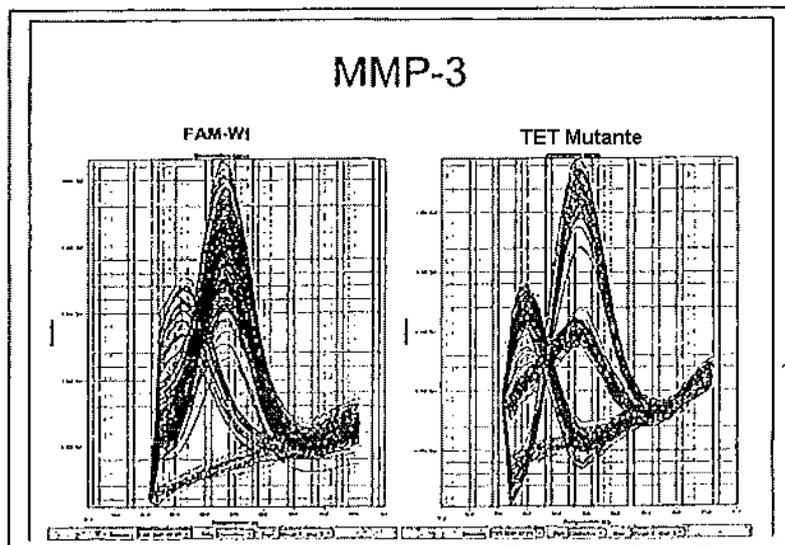


Figura 4. Tipaje del polimorfismo por curva de fusión post-amplificación por PCR del polimorfismo de MMP-3 en 102 muestras de DNA.

10

Figura 5

