

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 571**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06716196 .8**
96 Fecha de presentación: **03.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1856257**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTOS QUE UTILIZAN UN OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD Y OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD PARA LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
05.03.2005 KR 20050018419
26.04.2005 WO PCT/KR2005/001206

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
SEEGENE, INC.
8, 9F TAEWON BLDG. 65-5, BANGI-DONG
SONGPA-GU
SEOUL 138-050, KR

72 Inventor/es:
CHUN, Jong-Yoon

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 375 571 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

Procedimientos que utilizan un oligonucleótido de doble especificidad y oligonucleótido de doble especificidad para los mismos

5

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION
CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a diversos procedimientos que utilizan un oligonucleótido de doble especificidad y a un oligonucleótido de doble especificidad para los mismos. Más concretamente, la presente invención se refiere a diversos procedimientos mediante una reacción de extensión dependiente de molde que utiliza un oligonucleótido de doble especificidad y a un oligonucleótido de doble especificidad para la misma.

10

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

15

La amplificación de ácidos nucleicos es un proceso crucial para una amplia diversidad de métodos de la biología molecular, de modo que se han propuesto diversos métodos de amplificación. Por ejemplo, Miller H.I. *et al.* (patente WO n° 89/06700) amplificaron una secuencia de ácidos nucleicos basándose en la hibridación de un promotor/secuencia de cebador con un ADN monocatenario diana ("ADNmc") seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Entre otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos se incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción (Kwoh D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:1173, 1989; y Gingeras T.R. *et al.*, patente WO n° 88/10315).

20

El procedimiento más predominante para la amplificación de ácidos nucleicos conocido como reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo de nominado "PCR") se basa en ciclos repetidos de desnaturalización del ADN de doble cadena, seguido de la hibridación de un cebador oligonucleótido al molde de ADN, y la extensión del cebador por parte de una ADN polimerasa (Mullis *et al.*, patentes US n° 4.683.195, n° 4.683.202 y n° 4.800.159; Saiki *et al.*, Science 230:1350-1354, 1985). Los cebadores oligonucleótidos utilizados en la PCR están diseñados para hibridarse a cadenas opuestas del ADN molde. Los cebadores son extendidos por la ADN polimerasa, a partir de la que el producto de un cebador puede servir como cadena molde para el otro cebador en reacciones posteriores. El procedimiento de amplificación por PCR resulta en el incremento exponencial de fragmentos discretos de ADN cuya longitud está definida por los extremos 5' de los cebadores oligonucleótidos.

25

30

El éxito de las amplificaciones de ácidos nucleicos, en particular la amplificación por PCR, se basa en la especificidad con la que un cebador se hibrida únicamente a su secuencia diana (y no a secuencias no diana); por lo tanto, resulta importante optimizar esta interacción molecular. Que un cebador pueda hibridarse únicamente a su complemento perfecto o también a secuencias que presentan uno o más desapareamientos depende críticamente de la temperatura de hibridación. En general, una temperatura de hibridación más alta conducirá a una hibridación más específica del cebador con su molde perfectamente correspondiente, lo que a su vez incrementará la probabilidad de amplificar únicamente la secuencia diana. Por otra parte, puede tolerarse un número mayor de no correspondencias entre el molde y el cebador a temperaturas de hibridación más bajas. En consideración a este fenómeno, el ajuste de la temperatura de hibridación puede alterar la especificidad de apareamiento entre molde y cebador. Por ejemplo, en el caso de que no haya producto, la temperatura puede ser excesivamente alta para la hibridación. En el caso de existir varios productos de diferente tamaño en donde únicamente se encuentre presente un cebador, lo anterior indica que el cebador único se está hibridando con más de una región del molde. En este caso, debería incrementarse la temperatura de hibridación.

35

40

45

Además de la temperatura de hibridación, para determinar la especificidad de hibridación del cebador deben considerarse varios "parámetros de búsqueda de cebador", tales como longitud de cebador, el contenido de GC y la longitud del producto de PCR. Un cebador que satisfaga todos estos parámetros resultará en una mejora significativa de la especificidad de hibridación del cebador durante la amplificación del ADN diana, resolviendo simultáneamente los problemas de fondos y productos no específicos derivados de los cebadores utilizados en los experimentos. Es habitual que unos cebadores bien diseñados ayuden a evitar la hibridación y niveles de fondo no específicos, así como a distinguir entre los ADNc o moldes genómicos en la PCR de ARN.

50

55

Se han desarrollado muchos enfoques para mejorar la especificidad de hibridación de los cebadores y por lo tanto para conseguir la amplificación del producto deseado. Son ejemplos la PCR "touchdown" (Don *et al.*, Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, Nucleic Acids Res. 19:4008, 1991), la PCR de inicio en caliente (Daquila *et al.*, Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. Nucleic Acids Res. 19:3749, 1991), PCR anidada (Mullis y Faloona, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350, 1987) y la PCR "booster" (Ruano *et al.*, Biphasic amplification of very dilute DNA samples via booster PCR. Nucleic Acids Res. 17, 540, 1989). También se ha informado de que en

60

5 otros enfoques alternativos diversos compuestos "intensificadores" pueden mejorar la especificidad de la PCR. Entre los compuestos intensificadores se incluyen compuestos químicos que incrementan la temperatura de hibridación efectiva de la reacción, proteínas de unión al ADN y reactivos disponibles comercialmente. Sin embargo, no existe ningún aditivo "mágico" que garantice el éxito de todas las PCR y resulta muy laborioso someter a ensayo diferentes aditivos bajo diferentes condiciones, tales como la temperatura de hibridación. Aunque estos enfoques han contribuido en algunos casos a la mejora de la especificidad de hibridación de los cebadores, no han accedido fundamentalmente a una solución a los problemas planteados por los cebadores utilizados en la amplificación de PCR, tales como productos no específicos y niveles de fondo elevados.

10 Las técnicas basadas en la PCR han sido utilizadas ampliamente no sólo para la amplificación de una secuencia de ADN diana, sino también para aplicaciones o métodos científicos en los campos de la investigación biológica y médica, tales como la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR de expresión diferencial (DD-PCR), clonación de genes conocidos o desconocidos mediante PCR, amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), PCR de cebado arbitrario (AP-PCR), PCR multiplex, tipado genómico de SNP y análisis genómico basado en la PCR (McPherson y Moller, PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, NY, 2000).

15 Tal como se ha indicado anteriormente, todos estos métodos y técnicas que incluyen amplificación de ácidos nucleicos, notablemente la amplificación por PCR, no están completamente libres de las limitaciones y problemas, resultando de la no especificidad de los cebadores utilizados en cada método, tales como falsos positivos, pobre reproducibilidad, niveles de fondo elevados, aunque se han introducido continuamente enfoques mejorados en cada método. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos cebadores y métodos para mejorar la especificidad de hibridación, que pueda dar lugar a resultados de amplificación reales.

20 La hibridación de ADN sigue siendo un procedimiento fundamental de la biología molecular, y se ve afectado por la fuerza iónica, la composición de bases, la longitud de fragmento al que haya sido reducido el ácido nucleico, el grado de desapareamiento y la presencia de agentes desnaturalizantes. Las tecnologías basadas en la hibridación del ADN son una herramienta muy útil en la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicos y resultan claramente valiosas en el diagnóstico útil, en la investigación genética y en el análisis de laboratorio forense. Por ejemplo, Wallace y colaboradores han demostrado que diferencias de secuencia tan sutiles como un único cambio de base resultan suficientes para permitir la discriminación de oligómeros cortos (por ejemplo 14-meros) y han demostrado cómo podría aplicarse al análisis molecular de mutaciones puntuales en el gen de $\lambda\beta$ -globina (Wallace B.R. *et al.*, The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. Nucleic Acids Res. 9:879-894, 1981; y Conner, B.J., *et al.* Detection of sickle cell β -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 278-282, 1983).

25 A pesar de la capacidad que presenta la hibridación de oligonucleótidos de identificar correctamente una cadena complementaria, los investigadores todavía se enfrentan a limitaciones. Los híbridos que contienen oligonucleótidos son mucho menos estables que los híbridos de ácidos nucleicos largos. Esto se pone de manifiesto en una temperatura de fusión más baja. La inestabilidad de los híbridos es uno de los factores más importantes a considerar durante la preparación de la hibridación de oligonucleótidos. La diferencia de estabildades entre un complemento perfectamente correspondiente y un complemento desapareado en únicamente una base puede ser bastante reducida, correspondiendo incluso a una diferencia de tan sólo 0,5°C en sus T_m (temperatura de fusión del dúplex). Cuanto más corto es el oligómero de interés (permitiendo la identificación de una cadena complementaria dentro de una mezcla más compleja), más fuerte es el efecto del desapareamiento de una sola base sobre la estabilidad global del dúplex. Sin embargo, la desventaja de utilizar dichos oligonucleótidos cortos es que se hibridan débilmente, incluso con una secuencia perfectamente complementaria, y de esta manera deben utilizarse bajo condiciones de astringencia reducida, lo que resulta en una reducción considerable de la especificidad de la hibridación.

30 Se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos. Se ha propuesto un método para modificar químicamente bases del ADN para la hibridación de alta sensibilidad (Azhikina *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11460-11462, 1993) y un método en el que se lleva a cabo el lavado después de la hibridación a temperaturas bajas durante un periodo prolongado con el fin de incrementar la capacidad de discriminar el desapareamiento (Drmanac *et al.*, DNA and Cell Biology 9:527-534, 1990). Recientemente se ha presentado otro método para incrementar el poder de resolución de polimorfismos de un solo nucleótidos (SNPs) en la hibridación de ADN por medio de desapareamientos artificiales (Guo *et al.*, Nature Biotechnology 15:331-5, 1997). Además, muchas patentes estadounidenses, entre ellas las patentes US nº 6.077.668, nº 6.329.144, nº 6.140.054, nº 6.350.580, nº 6.309.824, nº 6.342.355 y nº 6.268.128, dan a conocer la sonda de hibridación y las aplicaciones de la misma. La patente US nº 2003/170711 A1 se refiere a oligonucleótidos con 3-nitropirrol contiguo como base universal para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana. Aunque han aparecido enfoques mejorados de cada método, ninguno de dichos métodos y técnicas que incluyen la hibridación de oligonucleótidos ha podido liberarse por completo de las limitaciones y problemas planteados por la no especificidad de la hibridación de oligonucleótidos.

Todavía existe otra posibilidad de que algunos factores artificiales, tales como la no transferencia de puntos o la mala inmovilización de los oligonucleótidos sobre el sustrato y errores en el establecimiento de condiciones de hibridación óptimas, afecten a los datos negativos de hibridación; el efecto de los resultados erróneos es más vulnerable a los resultados generados en el método de cribado de alto rendimiento. Dichos factores artificiales inherentes a la transferencia por puntos y a la hibridación son desventajas prácticas importantes de las micromatrices de oligonucleótidos de ADN.

Además, el desarrollo de las técnicas de determinación de la secuencia de ADN de mayores velocidad, sensibilidad y rendimiento son de importancia fundamental para el estudio de los sistemas biológicos. La técnica de secuenciación de ADN convencional, desarrollada originariamente hace más de dos décadas (Sanger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467, 1977), presenta limitaciones tanto de rendimiento como de coste para aplicaciones futuras. Por lo tanto se han propuesto varias técnicas nuevas. Tres métodos muy prometedores son la secuenciación mediante hibridación (Brain y Smith, J. Theor. Biol. 135:303-307, 1988), Drmanac *et al.*, Genomics 4:114-128, 1989) y Southern E.M., patente WO nº 10977, 1989), la secuenciación de firmas paralelas basada en la ligación y el corte (Brenner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 97:1665-1670, 2000) y la pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 242:84-89, 1996, y Science 281:363-365, 1998). Para todas las técnicas anteriormente indicadas, el éxito de las reacciones de secuenciación depende absolutamente de la especificidad de hibridación del cebador de secuenciación respecto al ácido nucleico diana. En la consideración de la especificidad de hibridación del cebador de secuenciación, los métodos actuales se encuentran limitados por la longitud de los ácidos nucleicos diana suministrados para las reacciones de secuenciación. En general, las reacciones de secuenciación se llevan a cabo utilizando ácidos nucleicos molde preferentemente de longitud inferior a unos cuantos cientos de pares de bases, de manera que se consigue en cierto grado la hibridación específica del cebador de secuenciación.

Sin embargo, para estudios avanzados, las reacciones de secuenciación de ADN de velocidad, sensibilidad y rendimiento incrementados no deben verse perjudicadas por el tamaño de los ácidos nucleicos diana. A la luz de lo anterior, se permite la secuenciación directa de un ácido nucleico diana a partir de una población de ácidos nucleicos molde a condición de que los cebadores de secuenciación se hibriden con los ácidos nucleicos diana con alta especificidad.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

Con el fin de eliminar los problemas y desventajas de dichos oligonucleótidos convencionales, utilizados a modo de cebadores o de sondas, y de diversos métodos que incluyen la hibridación de ácidos nucleicos, el presente inventor ha desarrollado un oligonucleótidos de doble especificidad que permite que una reacción dependiente del molde se produzca con una especificidad mucho más alta y ha encontrado excelentes aplicaciones en una amplia diversidad de procedimientos, incluyendo la hibridación o apareamiento de oligonucleótidos.

De acuerdo con lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos procedente de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos según la reivindicación 1.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada a continuación considerada conjuntamente con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figs. 1A y 1B representan esquemáticamente el principio de este oligonucleótido de doble especificidad (DS) de la presente invención en una reacción de extensión dependiente del molde. La fig. 1A muestra una especificidad elevada de hibridación del oligonucleótido de DS bajo condiciones de elevada astringencia. La fig. 1B muestra la tolerancia al desapareamiento del oligonucleótido de DS. La fig. 2 muestra representaciones esquemáticas para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ADN de doble cadena utilizando cebadores oligonucleótidos de DS de la presente invención. La fig. 3 muestra representaciones esquemáticas para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ARNm utilizando cebadores oligonucleótidos de DS de la presente invención. La fig. 4 muestra representaciones esquemáticas de reacciones de extensión dependientes de molde en la determinación selectiva de un ácido nucleico diana utilizando oligonucleótidos de doble especificidad sobre micromatrices de oligonucleótidos. La fig. 5 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la amplificación por PCR de genes de la familia de las citoquinas, IL-1 β e IL-19, utilizando un conjunto de cebadores convencionales (IL-1b-5'-0 y IL-1b-3'-0, carril 1; IL-19-5'-0 e IL-19-3'-0, carril 3) y los oligonucleótidos de doble especificidad (IL-1b-5' e IL-1b-3', carril 2; IL-19-5' e IL-19-3', carril 4). M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer (Seegene, Inc., Seoul, Corea). La fig. 6A es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados del 3'-RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc) del gen

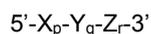
DEG 10, que demuestra la especificidad de PCR del oligonucleótido de doble especificidad. El carril 1 representa un cebador con una secuencia de correspondencia perfecta, los carriles 2 a 4 representan cebadores con desapareamientos de 3, 2 y 1 base en su parte 3' de especificidad a baja T_m , respectivamente, y los carriles 5 a 7 representan cebadores con desapareamientos de 5, 3 y 2 bases en su parte 5' de especificidad a alta T_m , respectivamente. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer. La fig. 6B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados del 3'-RACE del gen DEG 10, que demuestra la tolerancia a los desapareamientos del oligonucleótido de doble especificidad en la PCR. El carril 1 representa un cebador con una secuencia de correspondencia perfecta, los carriles 2 a 4 representan cebadores con desapareamientos de 3, 2 y 1 base en su parte 3' de especificidad a baja T_m , respectivamente, y los carriles 5 a 7 representan cebadores con desapareamientos de 5, 3 y 2 bases en su parte 5' de especificidad a alta T_m , respectivamente. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer. La fig. 7A representa las secuencias de los cebadores 5' para la 3'-RACE de los genes Pxs1 y Pxs2 de la familia homeobox específica de placenta de ratón. Pxs1-5'-40 y Pxs2-5'-40 son cebadores convencionales y Pxs1-5'-41 y Pxs2-5'-41 son cebadores diseñados según la presente invención. La fig. 7B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados del 3'-RACE de Pxs1 y Pxs2. Carril 1, 3'-RACE de Pxs1 utilizando el cebador oligonucleótido de doble especificidad Pxs1-5'-41; carril 2, 3'-RACE de Pxs2 utilizando el cebador oligonucleótido de doble especificidad Pxs2-5'-41; carril 3, 3'-RACE de Pxs1 utilizando el cebador convencional Pxs1-5'-40, y carril 4, 3'-RACE de Pxs2 utilizando el cebador convencional Pxs2-5'-40. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer. La fig. 8 muestra los resultados de la secuenciación directa por ciclado de los genes Pxs1 y Pxs2 a partir del grupo de ADNc de placenta de ratón utilizando los cebadores oligonucleótidos de doble especificidad Pxs1-5'-41 (para Pxs1) y Pxs2-5'-41 (para Pxs2) como cebador de secuenciación. La fig. 9 muestra los resultados de la PCR multiplex utilizando 9 conjuntos de cebadores de doble especificidad específicos de genes de la familia de las citoquinas. Carril 1, PCR multiplex de 9 genes de citoquina; carril 2, PCR monoplex de IL-3 (200 pb); carril 3, PCR monoplex de IL-15 (250 pb); carril 4, PCR monoplex de IL-18 (300 pb); carril 5, PCR monoplex de IL-25 (350 pb); carril 6, PCR monoplex de IL-2 (400 pb); carril 7, PCR monoplex de IL-6 (450 pb); carril 8, PCR monoplex de IL-19 (500 pb); carril 9, PCR monoplex de IL-1 β (550 pb), y carril 10, PCR monoplex de IL-10 (600 pb). M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer. La fig. 10 muestra los resultados de las amplificaciones por PCR del gen de la glucoproteína de fusión (F) del metaneumovirus humano (hMPV) mediante la utilización de los cebadores oligonucleótidos de doble especificidad. Carril 1, PCR de la diana utilizando el conjunto de cebadores de hMPV5'-585 y hMPV 3'-698; carril 2, PCR dirigida utilizando los conjuntos de cebadores de hMPV5'-585 y hMPV-3'-1007; carril 3, PCR dirigida utilizando cebadores de β -actina humana; carril 4, PCR de la diana sin molde; y carril 5, PCR de la diana sin molde.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCÓN

En la presente memoria se da a conocer: (a) una amplia diversidad de procedimientos que hacen uso de un oligonucleótido de doble especificidad, y (b) un oligonucleótido de doble especificidad para los mismos. El oligonucleótido de doble especificidad tal como se da a conocer en la presente memoria (en lo sucesivo denominado "oligo de DS") permite al cebador o sonda la hibridación con su secuencia diana con una especificidad mejorada, de manera que puede mejorarse significativamente la especificidad de la amplificación de los ácidos nucleicos (en particular de la PCR) y de la reacción de hibridación.

Oligonucleótido de doble especificidad (oligo de DS)

Se da a conocer en la presente memoria es un oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos mediante una reacción de extensión dependiente del molde, que se representa mediante la fórmula general siguiente:



en la que X_p representa una parte 5' de especificidad a alta T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio de un ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; Y_q representa una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales; Z_r representa una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; p, q y r representan los números de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a alta T_m es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja sin apareamiento de bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con el ácido nucleico molde, permitiendo que la parte 5' de especificidad a alta T_m se separe de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de hibridación con el ácido nucleico molde, de manera que la especificidad de

apareamiento del oligonucleótido está determinada dualmente, a partir de la parte 5' de especificidad a alta T_m y de la parte 3' de especificidad a baja T_m de manera que resulta incrementada la especificidad global de apareamiento del oligonucleótido.

5 La expresión "doble especificidad" en referencia al oligonucleótido de DS (en lo sucesivo denominado "oligo de DS") de la presente invención utilizada en la presente memoria se utiliza para referirse a su propiedad destacada de que su especificidad de apareamiento con una secuencia diana está determinada dualmente por sus dos partes separadas, es decir, la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m . En general, la especificidad de apareamiento de los cebadores o sondas se encuentra gobernado por su secuencia consecutiva
10 global. En contraste, la especificidad de apareamiento del oligo de DS está determinada dualmente por sus dos partes (la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m) separadas por la parte de separación, en donde estas tres partes se encuentran situadas en una secuencia oligonucleótida. Dicha doble especificidad permite que el oligo de DS pueda utilizarse como cebador y sonda de especificidad mucho mayor, de manera que la presente invención es una idea novedosa y no obvia respecto a la técnica anterior.

15 Entretanto, el presente inventor ya ha desarrollado el ACEP (cebador de control de hibridación) con el fin de mejorar la especificidad de apareamiento, tal como se da a conocer en la patente WO nº 03/050303. El oligo de DS de la presente invención es claramente diferente del ACP a la luz de lo siguiente: (i) el oligo de DS presenta dos partes de especificidad que deben hibridarse con una secuencia diana, mientras que el ACEP presenta una parte de especificidad, (ii) en el oligo de DS deben discriminarse claramente tres partes en vista de la T_m , al contrario que las partes del ACP, (iii) el cebador de DS se extiende para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde únicamente en el caso de que se produzca la hibridación tanto de la parte 5' de especificidad a alta T_m como la parte 3' de especificidad a baja T_m , mientras que el ACP se extiende incluso al producirse el apareamiento por la parte del extremo 3', y (iv) de esta manera la especificidad de apareamiento o de hibridación del oligo de DS
20 está determinada dualmente por las dos partes separadas, es decir, la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m , mientras que la de ACP está gobernada únicamente por la parte del extremo 3'. Por consiguiente, puede apreciarse que la especificidad de apareamiento o hibridación del oligo de DS con su secuencia diana es mucho más alta que la del ACP, de lo que se infiere que el oligo de DS es novedoso y no obvio en comparación con el ACP.

30 El rasgo característico del oligo de DS es que presenta tres partes diferentes con propiedades diferentes dentro de una sola molécula oligonucleótida: la parte 5' de especificidad a alta T_m , la parte 3' de especificidad a baja T_m y la parte de separación.

35 El oligo de DS resulta útil en una amplia diversidad de procedimientos y análisis que implican una reacción de extensión dependiente del molde. La expresión utilizada en la presente memoria, "reacción de extensión dependiente del molde" se refiere a una reacción que extiende una molécula oligonucleótida hibridada con una secuencia diana mediante la incorporación de nucleótidos sucesivos en su fracción terminal, en la que la secuencia extendida se determina a partir de una secuencia molde complementaria.

40 Una representación esquemática de los principios que gobiernan la especificidad de hibridación (apareamiento) del oligo de DS se ilustra en la fig. 1A. En referencia a la fig. 1A, se describe en mayor detalle el oligo de DS.

45 En el caso de que únicamente se hibride con un molde la parte 5' de especificidad a alta T_m del oligo de DS, no puede utilizarse como sitio de cebador para una extensión dependiente de molde, resultando en que no se produce extensión.

Mientras que la parte 5' de especificidad a alta T_m del oligo de DS se aparee con una secuencia no diana, la parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia más corta es improbable que se aparee con la secuencia no diana. Los motivos para ello son que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se encuentran separados por la parte de separación en términos de sucesos de apareamiento. En otras palabras, la parte 3' de especificidad a baja T_m participa en sucesos de apareamiento de una manera relativamente independiente de la parte 5' de especificidad a T_m elevada, y el apareamiento de la parte 3' de especificidad a T_m reducida resulta menos afectada por el apareamiento de la parte 5' de especificidad a T_m elevada. En este sentido, la probabilidad de apareamiento de la parte 3' de especificidad a T_m reducida con una secuencia no diana resulta mucho más baja.

60 En el caso de que únicamente la parte 3' de especificidad a T_m reducida presente una secuencia complementaria a un sitio no diana, el apareamiento no se produce bajo determinadas condiciones de elevada astringencia, por ejemplo condiciones restrictivas para el apareamiento de la parte 5' de especificidad a T_m elevada. Según una realización preferente, resulta ventajoso llevar a cabo reacciones de extensión dependientes de molde utilizando el oligo de DS bajo condiciones restrictivas con una temperatura de hibridación mucho más alta que la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m .

En el caso de que tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenten una secuencia sustancialmente complementaria a un molde, el oligo de DS puede aparearse con el molde y por lo tanto se produce con éxito la extensión.

Sin respaldo teórico se cree que la parte de separación provoca que la parte 3' de especificidad a Tm reducida resulte más sensible a las condiciones de hibridación (por ejemplo la temperatura y la complementariedad de las secuencias). A este respecto, la incidencia de la hibridación no específica entre la parte 3' de especificidad a Tm reducida y las secuencias no diana se reduce mucho bajo determinadas condiciones de hibridación (o restrictivas).

En el caso de que la parte 3' de especificidad a Tm reducida, así como la parte de especificidad a Tm elevada, se apareen con su secuencia diana, el extremo 3' de la parte 3' de especificidad a Tm reducida es más probable que genere un sitio extensible por parte de las ADN polimerasas.

El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligómero lineal de monómeros o enlaces naturales o modificados, incluyendo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y similares, capaces de hibridarse específicamente con una secuencia de nucleótidos diana, sea natural o de producción sintética. El oligonucleótido preferentemente es monocatenario para una eficiencia máxima de la hibridación. Preferentemente, el oligonucleótido es un oligodesoxirribonucleótido. El oligonucleótido de la presente invención puede comprender dNMP naturales (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), análogos de nucleótido o derivados de nucleótido. El oligonucleótido también puede incluir ribonucleótidos. Por ejemplo, el oligonucleótido de la presente invención puede incluir nucleótidos con modificaciones del esqueleto, tales como los péptido-ácido nucleico (APN) (M. Egholnn *et al.*, Nature 365:566-568, 1993), ADN fosforotioato, ADN fosforoditioato, ADN fosforamidato, ADN unido por enlaces amida, ADN unido por MMI, 2'-O-metil-ARN, alfa-ADN y metilfosfonato-ADN, nucleótidos con modificaciones de sacáridos, tales como 2'-O-metil-ARN, 2'-fluoro-ARN, 2'-amino-ARN, 2'-O-alquil-ADN, 2'-O-alil-ADN, 2'-O-alquinil-ADN, ADN con hexosas, piranosil-ARN y anhidrohexitol-ADN y nucleótidos que presenta modificaciones de las bases, tales como pirimidinas con sustitución en C-5 (con sustituyentes tales como flúor, bromo, cloro, yodo, metilo, etilo, vinilo, formilo, etinilo, propinilo, alquinilo, tiazolilo, imidazolilo o piridilo), 7-deazapurinas con sustituyentes en C-7 (entre ellos fluoro, bromo, cloro, yodo, metilo, etilo, vinilo, formilo, alquinilo, alquenilo, tiazolilo, imidazolilo, piridilo), inosina y diaminopurina.

El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis bajo condiciones en las que resulta inducida la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena (molde) de ácidos nucleicos, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, y una temperatura y pH adecuados. El cebador preferentemente es monocatenario para una eficiencia máxima de la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador de la presente invención puede comprender dNMP naturales (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales. El cebador también puede incluir ribonucleótidos. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de polimerización. La longitud exacta de los cebadores depende de muchos factores, entre ellos la temperatura, la aplicación y el origen del cebador. El término "apareamiento" o "cebado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la aposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, en donde la aposición permite que la polimerasa polimerice nucleótidos formando una molécula de ácidos nucleicos que es complementaria al ácido nucleico molde o a una parte del mismo. El término "hibridante" utilizado en la presente memoria se refiere a la formación de un ácido nucleico de doble cadena a partir de ácidos nucleicos monocatenarios complementarios. No se pretende realizar ninguna distinción entre los términos "de apareamiento" e "hibridante", y estos términos se utilizarán intercambiamente.

El término "sonda" utilizado en la presente memoria se refiere a una molécula monocatenaria de ácidos nucleicos que comprende una parte o partes que son sustancialmente complementarias a una secuencia de nucleótidos diana.

El término "parte" utilizado en la presente memoria conjuntamente con el oligo de DS de la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos separada por la parte de separación. La expresión "parte 5' de especificidad a Tm elevada" o "parte 3' de especificidad a Tm reducida" se refiere a una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' ó 3' del oligo de DS de la presente invención, respectivamente, que se encuentra separada por la parte de separación. La expresión "parte 5' de especificidad a Tm elevada" conjuntamente con el oligo de DS pretende referirse a una parte con la Tm más alta de entre las tres partes y que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde. La expresión "parte 3' de especificidad a Tm reducida" en referencia al oligo de DS se refiere a una parte con una Tm más baja que la parte 5' de especificidad a Tm elevada pero con una Tm más alta que la parte de separación y que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde.

El término "Tm" utilizado en la presente memoria se refiere a la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas de un ácido nucleico dúplex son monocatenarias. Los términos "Tm elevada" y "Tm reducida"

conjuntamente con las partes en el oligo de DS pretenden referirse a un valor relativo de la Tm y no a un valor absoluto de la Tm. Es decir, sólo resulta necesario que la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada sea elevada respecto a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida.

5 La parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida están diseñadas para presentar una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo. La expresión "sustancialmente complementario" en referencia al oligo de DS se utiliza en la presente memoria para referirse a que la molécula oligonucleotídica es suficientemente complementaria para hibridarse selectivamente con una secuencia molde de ácidos nucleicos bajo las condiciones de hibridación o restrictivas que se indican, de manera que el oligonucleótido apareado puede ser extendido por una polimerasa, formando una copia complementaria del molde. Por lo tanto, dicha expresión presenta un significado diferente de "perfectamente complementario" o expresiones relacionadas con la misma. Se apreciará que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida del oligo de DS puede presentar uno o más desapareamientos con un molde en la medida en que el oligo de DS pueda servir como cebador o sonda. Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o la parte 3' de especificidad a Tm reducida del oligo de DS presentan una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria a un sitio del molde, es decir, sin desapareamientos.

20 Para un buen rendimiento del oligo de DS, resulta esencial que la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada sea superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida. Resulta preferente que la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada se encuentre comprendida entre 40°C y 80°C, más preferentemente entre 40°C y 75°C, todavía más preferentemente entre 50°C y 68°C, y todavía más preferentemente entre 50° y 65°C. Resulta preferente que la Tm de la parte 3' de especificidad a Tm reducida se encuentre comprendida entre 10°C y 40°C, más preferentemente entre 15°C y 40°C, y todavía más preferentemente entre 20°C y 35°C. Preferentemente, la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior en por lo menos 5°C, más preferentemente en por lo menos 10°C, todavía más preferentemente en por lo menos 15°C, y todavía más preferentemente en por lo menos 20°C a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida. Ventajosamente, la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior en 5°C a 70°C, preferentemente en 10°C a 70°C, más preferentemente en 10°C a 60°C, todavía más preferentemente en 10°C a 50°C, todavía más preferentemente en 10°C a 40°C, y todavía más preferentemente en 20°C a 40°C a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida.

35 Según una realización preferente, la parte 5' de especificidad a Tm elevada es más larga que la parte 3' de especificidad a Tm reducida. La longitud de la parte 5' de especificidad a Tm elevada preferentemente presenta 15 a 40 nucleótidos, más preferentemente 15 a 30 residuos nucleótidos y más preferentemente 20 a 25 residuos nucleótidos. La longitud de la parte 3' de especificidad a Tm reducida preferentemente presenta 3 a 15 nucleótidos, más preferentemente 5 a 15 residuos nucleótidos y más preferentemente 6 a 12 residuos nucleótidos.

40 La parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales es parcialmente responsable de las ventajas y características del oligo de DS. La expresión "base universal" utilizada en la presente memoria se refiere a una base capaz de formar pares de bases con cada una de las 5 bases de ADN/ARN naturales con poca discriminación entre ellas.

45 Es ampliamente conocido que los nucleótidos en algunas posiciones ambiguas de cebadores degenerados han sido sustituidos por una base universal, tal como desoxiinosina (Ohtsuka E. *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985, y Sakanari J.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:4863-4867, 1989), 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol (Nichols R. *et al.*, Nature 369:492-493, 1994) y 5-nitroindol (Loakes D. *et al.*, Nucleic Acids Res. 22:4039-4043, 1994) para resolver los problemas de diseño asociados a los cebadores degenerados, debido a que dichas bases universales son capaces de apareamiento de bases no específico con las cuatro bases convencionales. Sin embargo, no se ha informado de que dichas bases universales permitan la formación de una parte de una molécula oligonucleotídica que genere una estructura de burbuja durante el apareamiento (hibridación) o la amplificación, separando de esta manera dos secuencias contiguas opuestas y resultando en el incremento de la especificidad de apareamiento de un cebador o sonda con una secuencia diana debido a la doble especificidad de dos partes separadas de especificidad (hibridantes).

55 Según una realización preferente, la base universal en la parte de separación se selecciona de entre el grupo que consiste de desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe-inosina, 2'-F-inosina, desoxi-3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe-3-nitropirrol, 2'-F-3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi-5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe-5-nitroindol, 2'-F-5-nitroindol, desoxi-4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi-4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxinebularina, 2'-F-nebularina, 2'-F-4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, APN-inosina, APN-4-nitrobencimidazol, APN-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobencimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietilinosina, 2'-O-metoxietilnebularina, 2'-O-metoxietil-5-nitroindol, 2'-O-metoxietil-

4-nitrobenzimidazol, 2'-0-metoxietil-3-nitropirrol y combinaciones de los mismos. Más preferentemente, la base universal o análogo de base no discriminatoria es la desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol, más preferentemente desoxiinosina.

- 5 Dichas bases universales pueden encontrarse contenidas en la parte de separación de modo contiguo o de modo interrumpido por otros nucleótidos tales como dNMPs. Resulta preferible que la parte de separación comprenda nucleótidos contiguos que presenten bases universales, preferentemente desoxiinosina.

10 Resulta crítico que la parte de separación del oligo de DS presente la Tm más baja de las tres partes a fin de que la parte de separación forme una estructura de burbuja en la que no se aparezcan las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se aparezcan al ácido nucleico molde, permitiendo que la parte 5' de especificidad a Tm elevada se diferencie de la parte 3' de especificidad a Tm reducida en términos de especificidad de apareamiento con el ácido nucleico molde, de manera que la especificidad de apareamiento del oligonucleótido se determina dualmente a partir de la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida, de manera que la especificidad de apareamiento global del oligonucleótido resulta considerablemente incrementada. Preferentemente, la Tm de la parte de separación es de entre 3°C y 15°C, más preferentemente de entre 4°C y 15°C, y todavía más preferentemente de entre 5°C y 10°C.

20 Según una realización preferente, la parte de separación entre la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida contiene por lo menos 3 bases universales, más preferentemente por lo menos 4 bases universales, y todavía más preferentemente por lo menos 5 bases universales. Según una realización preferente, la parte de separación contiene 2 a 10 bases universales, más preferentemente 3 a 10 bases universales, todavía más preferentemente 4 a 8 bases universales, y todavía más preferentemente 5 a 7 bases universales.

25 En el caso de que resulte necesario un cebador o sonda que presente una secuencia más larga, se ponen más de manifiesto las ventajas del oligo de DS. Por ejemplo, según una técnica convencional, un cebador que presente una secuencia de nucleótidos de más de 35 pb como secuencia hibridante es muy probable que genere amplicones no específicos. En contraste, el oligo de DS puede generar amplicones específicos incluso con secuencias largas, debido a que porta dos secuencias hibridantes (es decir, la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida) diferenciadas en términos de la interacción molecular con moldes (es decir, del apareamiento). Por ejemplo, el oligo de DS puede contener 35 a 45 pb de una secuencia hibridante complementaria a una secuencia diana. A este respecto, puede apreciarse que la presente invención permite diseñar cebadores con secuencias mucho más largas que se consideran no practicables en las estrategias convencionales de diseño de cebadores.

35 Según una realización preferente, la parte 5' de especificidad a Tm elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, siendo la parte de separación de entre 3 y 15 nucleótidos, y la parte 3' de especificidad a Tm reducida de entre 3 y 15 nucleótidos.

40 Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a Tm elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud de entre 3 y 10 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenta una longitud de entre 5 y 15 nucleótidos. Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a Tm elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud de entre 5 y 7 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenta una longitud de entre 6 y 10 nucleótidos. Según el oligo de DS ejemplar e ilustrativo descrito en los Ejemplos, la parte 5' de especificidad a Tm elevada presenta una longitud aproximada de 20 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud aproximada de 5 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenta una longitud aproximada de entre 8 y 10 nucleótidos.

45 En la realización más preferente, el oligo de DS se encuentra representado por la fórmula general siguiente: 5'-X_p-(dl)_q-Z_r 3' (la definición y características de X_p y Z_r son las indicadas anteriormente, dl representa desoxiinosina, (dl)_q representa una parte de separación que comprende nucleótidos contiguos que presentan bases universales, y q es un número entero entre 5 y 7).

50 Resulta interesante que el presente oligo de DS también presenta tolerancia al desapareamiento bajo condiciones restrictivas suficiente para tolerar el desapareamiento con su secuencia diana.

55 Una representación esquemática de los principios que gobiernan la tolerancia al desapareamiento del oligo de DS se ilustra en la fig. 1B. Pueden tolerarse uno o más, preferentemente uno a tres desapareamientos de bases en la parte 5' de especificidad a Tm elevada bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se aparezcan con el molde. Pueden tolerarse uno o más, preferentemente uno a dos desapareamientos de bases en la parte 3' de especificidad a Tm reducida bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se aparezcan con el molde. Pueden

tolerarse uno o más, preferentemente uno a cinco desapareamientos de bases tanto en la parte 5' de especificidad a Tm elevada como en la parte 3' de especificidad a Tm reducida bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada como la parte 3' de especificidad a Tm reducida se apareen con el molde.

5 Para imponer tolerancia al desapareamiento al oligo de DS, resulta importante las condiciones del apareamiento, notablemente la temperatura de hibridación. El apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida, aunque el apareamiento de todas las partes se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenten una o más, aunque un número limitado, de bases desapareadas con su sitio diana. Resultan necesarios oligos de DS que presentan tolerancia al desapareamiento para amplificar o detectar una secuencia de nucleótidos con diversidad genética. Los oligos de DS con tolerancia al desapareamiento pueden aparearse con secuencias diana que muestran diversidad genética, resultando en el buen funcionamiento de la amplificación y detección de las secuencias de nucleótidos de interés. En otras palabras, el oligo de DS desarrollado originalmente para incrementar drásticamente la especificidad de apareamiento e hibridación también pueden utilizarse en procedimientos que requieran tolerancia al desapareamiento en los que las condiciones de hibridación o restrictivas se ajustan convenientemente.

También se da a conocer en la presente memoria un método que permite determinar dualmente una especificidad de apareamiento de un oligonucleótido a partir de una estructura del oligonucleótido, comprendiendo las etapas siguientes: (a) seleccionar una secuencia diana de ácidos nucleicos, (b) diseñar una secuencia de un oligonucleótido que presente: (i) una secuencia hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (ii) una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales, de manera que la parte de separación interviene en la secuencia hibridante formando tres partes en el oligonucleótido, y (c) determinar la posición de la parte de separación en el oligonucleótido que permita que una parte en la dirección 5' de la parte de separación presente una Tm más alta que una parte en la dirección 3' de la parte de separación y que permita que la parte de separación presente la Tm más baja de las tres partes, proporcionando de esta manera un oligonucleótido que presenta tres partes diferenciadas con diferentes valores de Tm en el que: (i) una parte 5' de especificidad a Tm elevada del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, (ii) una parte 3' de especificidad a Tm reducida del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (iii) la parte de separación del oligonucleótido entre la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida comprende por lo menos dos bases universales, y la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida y la parte de separación presenta la Tm más baja de las tres partes, en donde la especificidad de apareamiento del oligonucleótido con el ácido nucleico diana se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada como la parte 3' de especificidad a Tm reducida.

El propósito del presente método es proporcionar un nuevo enfoque para incrementar drásticamente la especificidad de apareamiento de un oligonucleótido que debe hibridarse con su secuencia diana. El presente método también se expresa como método para mejorar una especificidad de apareamiento de un oligonucleótido. Además, el presente método se expresa como un método que utiliza una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales para mejorar la especificidad de apareamiento de un oligonucleótido hibridado con una secuencia diana.

El presente método se lleva a cabo con el fin de preparar el oligo de DS comentado anteriormente en la presente memoria. Por lo tanto, en aras de evitar una redundancia excesiva, las descripciones comunes no se repiten sino que se incorporan en la presente descripción del método como si se hubiesen repetido.

La mayoría de los métodos convencionales para diseñar cebadores o sondas utilizan meramente una secuencia de la máxima hibridabilidad disponible con sus secuencias dianas. Además, con el fin de incrementar la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos, convencionalmente se ha intentado ajustar las condiciones de amplificación o hibridación, tales como la temperatura y la concentración iónica.

En contraste, el presente método proporciona una nueva estrategia para incrementar la especificidad de apareamiento mediante la introducción de nuevas características en las secuencias oligonucleótidas mismas. La expresión "mediante una estructura del oligonucleótido" utilizada en la presente memoria con referencia a que permite determinar la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos se refiere a que la estructura del oligonucleótido contribuye en gran medida al incremento de especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos al imponer a los oligonucleótidos una nueva característica que se determina dualmente en términos de especificidad de apareamiento.

60 Resulta crítico en el presente método diseñar una secuencia oligonucleótida que presente: (i) una secuencia hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (ii) una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales. En esta etapa, se presentan las líneas básicas de la estructura del oligonucleótido con el fin de mostrar una parte de extremo 5'/parte de separación/parte de extremo 3' del

oligonucleótido. Las partes tanto de extremo 5' como de extremo 3' portan una secuencia hibridante sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana y presentan entre ellas la parte de separación.

5 La etapa más crítica en el presente método es determinar la posición de la parte de separación en el oligonucleótido con el fin de permitir que una parte situada en el lado 5' de la parte de separación presente una Tm superior a la de una parte situada en el lado 3' de la parte de separación, y con el fin de permitir que la parte de separación presente la Tm más baja de las tres partes, proporcionando de esta manera un oligonucleótido que presenta tres partes diferenciadas con diferentes valores de Tm.

10 Las nuevas características estructurales introducidas en los oligonucleótidos por el presente método son: (i) tres partes diferenciadas (parte 5' de especificidad a Tm elevada, parte de separación y parte 3' de especificidad a Tm reducida) en secuencias oligonucleótidas, (ii) diferentes valores de Tm de las tres partes, (iii) parte de separación entre la parte 5' de especificidad a Tm elevada y parte 3' de especificidad a Tm reducida que comprende por lo menos dos bases universales, (iv) dos partes implicadas en la interacción molecular con dianas durante la etapa de apareamiento, que se encuentran separadas en términos de sucesos de apareamiento por la parte de separación, (v) valores que siguen el orden siguiente: parte 5' de especificidad a Tm elevada, parte 3' de especificidad a Tm reducida y parte de separación. Dichas características estructurales garantizan la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos proporcionada finalmente por la presente invención que se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada como de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, permitiendo el drástico incremento de la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos con su secuencia diana.

Los oligonucleótidos diseñados y preparados según el presente método muestran una especificidad de apareamiento mucho más alta que los que no presentan dichas tres partes.

25 Las características y ventajas del oligo de DS se describen a continuación:
 (a) la parte de separación del oligo de DS comprende por lo menos dos bases universales que genera la región de Tm más baja en el oligo de DS, de manera que forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se hibridan con el ácido nucleico molde. Dicha estructura de burbuja en la que no se aparean las bases permite que la parte 5' de especificidad a Tm elevada se separe de la parte 3' de especificidad a Tm reducida en términos de especificidad de apareamiento con el ácido nucleico molde.
 (b) La Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, y la parte de separación muestra la Tm más baja, lo que permite establecer condiciones restrictivas bajo las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida.
 (c) De esta manera, la especificidad de apareamiento global del oligo de DS se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida, y
 (d) En consecuencia, la especificidad de apareamiento global del oligo de DS resulta drásticamente mejorada.

40 Puede apreciarse que el oligo de DS dado a conocer en la presente memoria resulta muy útil en una diversidad de (i) métodos de amplificación de ácidos nucleicos basados en cebadores, tales como los métodos de Miller H.L. (patente WO n° 89/06700) y Davey C. *et al.* (patente EP n° 329.822), reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu D.Y *et al.*, Genomics 4:360, 1989), reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany, PCR Methods and Applic. 1:5-16, 1991), la gap-LCR (patente WO n° 90/01069), la reacción de reparación de cadena (patente EP n° 439.182), la reacción 3SR (Kwoh *et al.*, PNAS, USA 86:1173, 1989) y la reacción NASBA (patente US n° 5.130.238), (ii) tecnologías basadas en la extensión de cebadores, tales como la secuenciación cíclica (Kretz *et al.*, Cycle sequencing. PCR Methods Appl. 3:S107-S112, 1994) y la pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 242:84-89, 1996) y Science 281:363-365, 1998), e (iii) tecnologías basadas en la hibridación, tales como la detección de una secuencia de nucleótidos diana utilizando una micromatriz de oligonucleótidos.

50 El oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria puede aplicarse a una diversidad de tecnologías basadas en la amplificación, secuenciación e hibridación de ácidos nucleicos. Son ejemplos representativos para demostrar el efecto del oligo de DS los siguientes:

I. Aplicación a la síntesis de una molécula de ácidos nucleicos

55 En la presente memoria se da a conocer un método para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos utilizando un oligonucleótido de doble especificidad mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que comprende las etapas siguientes:

60 (a) apareamiento del oligonucleótido de doble especificidad con una molécula molde de ácidos nucleicos, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a Tm elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases

universales y una parte 3' de especificidad a Tm reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, en donde la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, la parte de separación presenta la Tm más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se hibridan con el ácido nucleico molde, en la que el apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida, y

(b) extensión del oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al ácido nucleico diana.

Debido a que el método de síntesis utiliza el oligo de DS dado a conocer en la presente memoria, se omiten las descripciones comunes con el fin de evitar complejidad de la presente memoria que conlleva una excesiva redundancia.

Dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria puede proporcionar un método mejorado para sintetizar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia diana mediante una reacción de extensión dependiente de molde que incluye etapas de apareamiento y extensión. En particular, la síntesis de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia diana puede conseguirse repitiendo el procedimiento de la reacción de extensión dependiente de molde en la que tras las etapas de apareamiento y extensión se realiza una etapa de desnaturalización.

El método dado a conocer en la presente memoria puede utilizarse para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria a cualquier molécula molde de ácidos nucleicos. Dicha molécula puede ser de ADN o ARN. La molécula puede encontrarse en forma de doble cadena o de una cadena. En el caso de que el ácido nucleico como material de partida sea de doble cadena, resulta preferente convertir las dos cadenas a una forma monocatenaria o parcialmente monocatenaria. Entre los métodos conocidos para separar cadenas se incluyen, aunque sin limitación, el calentamiento, los tratamientos con álcali, formamida, urea o glicoxal, los métodos enzimáticos (por ejemplo la acción de una helicasa) y las proteínas de unión. Por ejemplo, la separación de cadenas puede conseguirse mediante calentamiento a una temperatura comprendida entre 80°C y 105°C. Los métodos generales para llevar a cabo este tratamiento se proporcionan en Joseph Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

En el caso de que se utilice un ARNm como material de partida, resulta necesaria una etapa de transcripción inversa previamente a la realización de una etapa de apareamiento, los detalles de la cual pueden encontrarse en Joseph Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Noonan K.F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16:10366, 1988). Para la transcripción inversa, se utiliza un cebador oligonucleótido dT hibridable con una cola poliA de ARNm. El cebador oligonucleótido dT comprende dTMPs, uno o más de los cuales puede sustituirse por otros dNMPs con la condición de que el cebador dT pueda funcionar como cebador. La transcripción inversa puede llevarse a cabo con una transcriptasa inversa que presente actividad de ARNasa H. En el caso de que se utilice un enzima que presente actividad de ARNasa H, puede resultar posible omitir una etapa separada de digestión con ARNasa H seleccionando cuidadosamente las condiciones de reacción.

Los presentes métodos no requieren que las moléculas molde de ácidos nucleicos presenten ninguna secuencia particular o longitud de secuencia. En particular, entre las moléculas se incluye cualquier ácido nucleico de origen natural procariótico, eucariótico (por ejemplo protozooario o parasitario, fúngico, de levadura, de planta superior, de animal inferior o superior, incluyendo mamíferos y seres humanos), vírico (por ejemplo de virus herpes, VIH, virus influenza, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus polio, etc.) o viroide. La molécula de ácidos nucleicos también puede ser cualquier molécula de ácidos nucleicos que ha sido, o puede ser, sintetizada químicamente. De esta manera, la secuencia de ácidos nucleicos puede encontrarse o no en la naturaleza.

El oligo de DS utilizado en la presente memoria se hibrida o aparea con un sitio del molde, de manera que se forma una estructura de doble cadena. Las condiciones de hibridación de los ácidos nucleicos adecuadas para formar dichas estructuras de doble cadena se describen en Joseph Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Haymes B.D. *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington D.C., 1985. Las secuencias de la parte 5' de especificidad a Tm elevada y de la parte 3' de especificidad a Tm reducida del oligo de DS no necesitan mostrar una complementariedad exacta, sino que únicamente deben ser de secuencia sustancialmente complementaria para poder formar una estructura de doble cadena estable. De esta manera, son permisibles las desviaciones respecto a la complementariedad total, con la condición de que dichas desviaciones no sean suficientes para impedir por completo la hibridación para formar una estructura de doble cadena. El apareamiento del oligo de DS con un sitio del ácido nucleico molde es un requisito previo para su polimerización dependiente de molde con polimerasas. Los

factores (ver Joseph Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Haymes B.D. *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington D.C., 1985) que afectan al apareamiento de bases de los oligo de DS con sus ácidos nucleicos complementarios afectan posteriormente a la eficiencia de cebado. La composición de nucleótidos del oligo de DS puede afectar a la temperatura a la que el apareamiento es óptimo y por lo tanto puede afectar a su eficiencia de cebado.

La parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida del oligo de DS durante la etapa de apareamiento desempeñan un papel como parte hibridante o como sitio determinante de especificidad (es decir, sitio determinante de doble especificidad), mientras que la parte de separación no sirve como sitio de hibridación y no interactúa con el molde para el apareamiento de bases.

Puede utilizarse una diversidad de ADN polimerasas en la etapa de extensión de los presentes métodos, que incluyen fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa termoestable, y la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Preferentemente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que puede obtenerse de una diversidad de especies bacterianas, incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* y *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Durante la realización de una reacción de polimerización, resulta preferible que los componentes necesarios para dicha reacción se proporcionen en exceso dentro del reactor. El término "exceso" en referencia a los componentes de la reacción de extensión se refiere a una cantidad de cada componente que permite que la capacidad para conseguir la extensión deseada no se encuentre sustancialmente limitada por la concentración de dicho componente. Resulta deseable proporcionar a la mezcla de reacción una cantidad de cofactores necesarios, tales como Mg²⁺, dATP, dCTP, dGTP y dTTP en cantidad suficiente para proporcionar soporte al grado de extensión deseado.

El apareamiento o hibridación en el presente método se lleva a cabo bajo condiciones restrictivas que permiten la unión específica entre el oligo de DS y el ácido nucleico molde. Dichas condiciones restrictivas para el apareamiento son dependientes de la secuencia y se modifican dependiendo de los parámetros ambientales. En el presente método, la etapa de apareamiento generalmente se lleva a cabo bajo condiciones restrictivas. Sin embargo, en el caso de que se aplique el presente método a procedimientos que requieren tolerancia al desapareamiento, resulta preferible que la etapa de apareamiento se lleve a cabo bajo condiciones restrictivas en las que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se aparean al molde a pesar de la presencia de uno o más, aunque un número limitado, de desapareamientos de bases. Dicha tolerancia al desapareamiento resulta muy útil en la amplificación o detección de un gen con diversidad genética. Las condiciones restrictivas pueden determinarse fácilmente a partir del estándar conocido de la técnica.

Resulta ventajoso llevar a cabo la etapa de apareamiento a una temperatura de hibridación superior a la Tm de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, garantizando que no se produce únicamente el apareamiento con la parte 3' de especificidad a Tm reducida. Preferentemente, la temperatura de hibridación es superior en por lo menos 5°C, más preferentemente en por lo menos 10°C, todavía más preferentemente en por lo menos 15°C, y todavía más preferentemente en por lo menos 20°C a la Tm de la parte 3' de especificidad a Tm reducida.

En una realización preferente, la temperatura de hibridación se encuentra comprendida entre 40°C y 75°C, más preferentemente entre 45°C y 72°C, todavía más preferentemente entre 50°C y 68°C, y todavía más preferentemente entre 55°C y 65°C. Las temperaturas de apareamiento adecuadas en el presente método pueden determinarse considerando independientemente los valores de Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida. En otras palabras, las temperaturas de apareamiento en el presente método no deben determinarse a partir de la longitud total y composiciones de nucleótidos de tanto la parte 5' de especificidad a Tm elevada como la parte 3' de especificidad a Tm reducida, sino a partir de la longitud y composición de nucleótidos individuales de la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o de la parte 3' de especificidad a Tm reducida. Habitualmente, la temperatura de hibridación determinada a partir de la consideración de únicamente la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada puede ser muy superior a la Tm de la parte 3' de especificidad a Tm reducida y convertirse en una óptima.

En el caso de que se requiera una tolerancia al desapareamiento en la etapa de hibridación, resulta preferente que la temperatura de hibridación se ajuste para que sea inferior a las indicadas anteriormente.

El presente método puede combinarse con muchos otros procedimientos conocidos de la técnica para conseguir un objetivo específico. Por ejemplo, el aislamiento (o purificación) del producto sintetizado puede realizarse después de la reacción de extensión. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante electroforesis en gel, cromatografía de columna, cromatografía de afinidad o hibridación. Además, el producto sintetizado de la presente invención puede insertarse en un vehículo adecuado para la clonación. Adicionalmente, el producto sintetizado dado a conocer en la presente memoria puede expresarse en un huésped adecuado que aloje un vector de expresión.

II. Aplicación a la amplificación de una secuencia diana de ácidos nucleicos

En todavía otro aspecto, se da a conocer un método para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende amplificar la secuencia diana de ácidos nucleicos llevando a cabo por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando una pareja de oligonucleótidos de doble especificidad como cebador, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico diana para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico diana para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con el ácido nucleico diana, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce únicamente el apareamiento con la parte 3' de especificidad a T_m reducida.

Debido a que el método de amplificación utiliza el oligo de DS dado a conocer en la presente memoria, se omiten las descripciones comunes con el fin de evitar complejidad de la presente memoria que conlleva una excesiva redundancia. Además, debido a que dicho método implica procedimientos de hibridación y extensión, se han omitido las descripciones referentes a los dos procedimientos a fin de evitar complejidad en la presente invención que conlleve una excesiva redundancia. Por ejemplo, la composición y estructura del oligo de DS utilizado y las condiciones de hibridación y extensión son comunes en este procedimiento y en el método de síntesis de la molécula de ácidos nucleicos anteriormente comentada.

Dicha aplicación que utiliza el oligo de DS dado a conocer en la presente memoria puede proporcionar un método mejorado para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico o de una mezcla de ácidos nucleicos (ADN o ARNm) mediante la realización de amplificaciones de ácidos nucleicos, preferentemente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

En la fig. 2 se ilustra una representación esquemática de la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana de ADN de doble cadena mediante la utilización del oligo de DS indicado anteriormente. Tal como se muestra en la fig. 2, se hibrida una pareja de oligos de DS con un molde de ADNdc desnaturalizado. La parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida durante la hibridación desempeñan una función como parte hibridante o sitio determinante de especificidad (es decir, sitio determinante de doble especificidad), mientras que la parte de separación no sirve como sitio de hibridación y no interactúa con el molde para el apareamiento de bases. En este momento, la parte de separación forma una estructura de burbuja en el oligo de DS con el fin de que dos partes terminales, es decir, la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida puedan separarse espacialmente para determinar dualmente la especificidad global del oligo de DS. Los detalles de las reacciones posteriores son similares a los de las amplificaciones de ácidos nucleicos convencionales basadas en cebadores conocidas de la técnica e indicadas anteriormente en la presente memoria.

El presente método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basadas en cebadores conocidas de la técnica. Preferentemente, los métodos se llevan a cabo según el procedimiento de PCR dado a conocer en las patentes US n° 4.683.195, n° 4.683.202 y n° 4.800.159, más preferentemente mediante el método de PCR de inicio en caliente.

La fig. 3 ilustra una representación esquemática de la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana de ARNm mediante la utilización del oligo de DS. En la primera etapa, el ARNm obtenido a partir de diversas muestras biológicas se transcribe inversamente utilizando el cebador oligo-dT hibridable con la cola poli-A del ARNm y transcriptasa inversa. Pueden obtenerse mayor información sobre la transcripción inversa en Joseph Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Noonan K.F. *et al.*, Nucleic Acids Res. 16:10366, 1988). La descripción de las reacciones posteriores es similar a la de las amplificaciones de ácidos nucleicos convencionales basadas en cebadores conocidas de la técnica que se han comentado anteriormente.

III. Aplicación a la amplificación multiplex de ADN

En un aspecto adicional, se da a conocer un método para amplificar dos o más secuencias diana de nucleótidos simultáneamente utilizando dos o más parejas de cebadores en la misma reacción, que comprende amplificar las secuencias diana de nucleótidos mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador,

extensión de cebador y desnaturalización, utilizando dos o más parejas de oligonucleótidos de doble especificidad como cebadores, caracterizado porque los oligonucleótidos de doble especificidad presentan tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con la secuencia diana de nucleótidos, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a T_m reducida.

Dicha aplicación que utiliza el oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria también puede proporcionar un método mejorado para amplificar más de una secuencia diana utilizando más de una pareja de cebadores en la misma reacción. En general, resulta extremadamente difícil preparar condiciones de PCR multiplex para amplificar más de 10 secuencias diana en paralelo, debido a que resulta necesaria una reacción de PCR óptima para amplificar incluso un solo locus específicos sin que aparezca ningún producto secundario inespecífico. Debido a que es necesario que la hibridación tenga lugar a una temperatura suficientemente elevada para permitir que se produzcan en la reacción correspondencias ADN-ADN perfectas, el oligo de DS de la invención resulta ideal para optimizar la amplificación multiplex de ADN debido a su acción de mejora de la especificidad de la amplificación. La expresión "PCR multiplex" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la amplificación simultánea de múltiples dianas de ADN en una única mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una realización específica, dicho procedimiento de multiplexado comprende la realización de una reacción de amplificación que comprende por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando las parejas de cebadores del oligo de DS, caracterizado porque los cebadores son oligonucleótidos de doble especificidad que presentan tres partes, en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con la secuencia diana de nucleótidos, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a T_m reducida.

Debido a que dicha aplicación que utiliza el oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria se lleva a cabo según el presente método de amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos comentada anteriormente, excepto por la utilización de más de una secuencia diana de nucleótidos y parejas de cebadores, las descripciones comunes han sido omitidas a fin de evitar complejidad en la presente memoria que conlleve una redundancia excesiva. Por ejemplo, la composición y estructura del oligo de DS utilizado y las condiciones de hibridación son comunes en este procedimiento y en los presentes métodos de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos anteriormente comentada.

Según una realización preferente, la temperatura de hibridación es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente de entre 45°C y 68°C, todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C, y todavía más preferentemente de entre 55°C y 65°C.

En una realización preferente, los productos amplificados de cada una de las secuencias diana de nucleótidos presentan un tamaño diferente para el análisis posterior. Según una realización preferente, los productos de amplificación de múltiples secuencias diana de nucleótidos pueden analizarse mediante la separación por tamaño. La comparación por separación por tamaño se lleva a cabo utilizando una diversidad de métodos conocidos de la técnica, tales como la electroforesis a través de una matriz de gel de poliacrilamida o una matriz de gel de agarosa y la secuenciación de los nucleótidos. La secuenciación de los nucleótidos puede llevarse a cabo rápidamente utilizando un secuenciador automático disponible de diversos fabricantes.

Tal como se ejemplifica en el Ejemplo, posteriormente, el multiplexado de la presente invención permite que los productos amplificados finales se encuentren libres de los problemas de ruido de fondo, así como de la inespecificidad que resulta de los procedimientos multiplex convencionales conocidos de la técnica.

La ventaja de la amplificación multiplex es que pueden someterse a ensayo en la misma reacción numerosas enfermedades o alteraciones de secuencias de nucleótidos específicas (por ejemplo los polimorfismos de nucleótidos individuales o las mutaciones puntuales). El número de análisis que pueden realizarse simultáneamente es ilimitado; sin embargo, el límite superior probablemente es aproximadamente 20 y probablemente depende de la diferencia de tamaño necesaria para la resolución y los métodos disponibles para resolver el producto amplificado.

El método dado a conocer puede aplicarse al diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas, a la determinación del sexo, al análisis de ligamientos génicos y a estudios forenses.

IV. Aplicación a la secuenciación del ADN

La especificidad mejorada permite utilizar el oligo de DS en la secuenciación directa a modo de cebador en la secuenciación en fase solución (en particular la secuenciación cíclica) o a modo de sonda en la secuenciación en fase sólida (en particular la secuenciación con chip de secuenciación) mediante la utilización del principio de extensión dependiente de molde del oligo de DS.

En todavía un aspecto adicional, se da a conocer un método de secuenciación de una molécula diana de ácidos nucleicos utilizando un oligonucleótido de doble especificidad de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas siguientes:

- (a) síntesis de una molécula de ácidos nucleicos complementaria a una molécula diana de ácidos nucleicos que debe secuenciarse mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando el oligonucleótido de doble especificidad a modo de cebador de secuenciación, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con la secuencia diana de ácidos nucleicos, en el que el apareamiento en la reacción de síntesis se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a T_m reducida, y
- (b) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácidos nucleicos complementaria sintetizada.

Generalmente, la secuenciación del ADN se lleva a cabo mediante diversas metodologías, tales como la secuenciación de Maxam-Gilbert, la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación y la secuenciación mediante digestión con exonucleasa. El presente método de secuenciación pretende mejorar la pirosecuenciación, así como la secuenciación mediante ciclado térmico.

El presente método puede llevarse a cabo según variaciones del método dideoxi de Sanger. La secuenciación mediante ciclado térmico de la presente invención puede realizarse en ácidos nucleicos molde amplificados mediante PCR. Además, la secuenciación mediante ciclado térmico se lleva a cabo con un ácido nucleico molde que no ha sido amplificado mediante PCR inmediatamente antes de la secuenciación.

Brevemente, la secuenciación de Sanger se basa en el principio de que la ADN polimerasa incorporará 2',3'-dideoxinucleótidos en cadenas de ácidos nucleicos, resultando en la terminación de la cadena (Sanger *et al.*, PNAS USA 74:5463, 1977). El método desarrollado por Sanger se refiere al método dideoxi de terminación de cadena. En la técnica más tradicional de dicho método, un segmento de ADN del que se desea conocer la secuencia, se clona en un fago de ADN monocatenario tal como M13. Estos fagos de ADN pueden servir de molde para la síntesis con cebador de la cadena complementaria por parte del fragmento Klenow de la ADN polimerasa L. El cebador es un oligonucleótido sintético que se hibrida específicamente con una región del vector M13 en posición próxima al extremo 3' de la inserción clonada. En cada una de las cuatro reacciones de secuenciación, la síntesis con cebador se lleva a cabo en presencia de suficiente análogo dideoxi de uno de los cuatro posibles desoxinucleótidos para que las cadenas en crecimiento se terminen aleatoriamente al incorporarse dichos nucleótidos de terminación. La concentración relativa de formas dideoxi y desoxi se ajusta para proporcionar un abanico de sucesos de terminación correspondiente a todas las posibles longitudes de cadena que pueden resolverse mediante electroforesis en gel. Se utilizan etiquetas incorporadas en las cadenas en crecimiento para revelar una imagen autorradiográfica del patrón del ADN en cada carril de la electroforesis. La secuencia de los desoxinucleótidos en el ácido nucleico molde clonado se determina a partir de un examen del patrón de bandas en los cuatro carriles.

A modo de variación del método de Sanger, el método de secuenciación mediante ciclado térmico normalmente

implica la utilización de soluciones que contienen un ácido nucleico cebador de secuenciación, desoxinucleósidos trifosfato, uno o más dideoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs), una solución tampón adecuada, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo la polimerasa Taq) y el ácido nucleico molde que debe secuenciarse. Puede encontrarse mayor información sobre la secuenciación mediante ciclado térmico en las patentes US nº 5.432.065, nº 5.723.298, nº 5.756.285, nº 5.817.797 y nº 5.831.065. Los procedimientos del método se llevan a cabo generalmente bajo condiciones de ciclado térmico similares a las de la PCR común.

Tras llevar a cabo una reacción de secuenciación en un ácido nucleico molde, la determinación de la secuencia de la molécula requiere que se identifiquen los productos de reacción. Se conoce de la técnica un número considerable de métodos de detección. Estos métodos generalmente implican la detección de etiquetas, incluyendo nucleótidos radioactivos, etiquetas fluorescentes, infrarrojas y quimioluminiscentes, tal como se describe en Ausubel F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 1993. Los marcajes pueden etiquetarse con cebadores o ddNTP, preferentemente ddNTP. El marcaje más preferente es fluorescente, incluyendo los pigmentos 6-carboxifluoresceína, 6-carboxi-X-rodamina, 3-(ϵ -carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina, 6-carboxi-X-rodamina, derivados del ácido 4,4-difluoro-4-bora-3 α ,4 α -diazas-indacén-3-propiónico y 4,7-diclororodamina.

Preferentemente, la temperatura de hibridación es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente de entre 45°C y 68°C, y todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C.

El presente método demuestra que permite realizar una secuenciación altamente específica de una molécula diana de ácidos nucleicos, tal como se demuestra en los Ejemplos, posteriormente. Más concretamente, los genes de la familia homeobox específica de placenta de ratón P₁ y P₂ pueden secuenciarse diferencialmente utilizando su cebador de secuenciación diseñado para presentar una estructura única del oligo de DS. Se subraya dicha secuenciación diferencial en el sentido de que las secuencias globales de los cebadores de secuenciación son diferentes en únicamente una base en la parte 3' de especificidad a T_m reducida.

Inesperadamente, el presente método permite secuenciar directamente una molécula diana de ácidos nucleicos contenida en un ADN genómico o en una población de ADNc sin purificación o aislamiento. No se ha informado todavía de que se haya podido llevar a cabo la secuenciación directa de una molécula diana de ácidos nucleicos en un ADN genómico o en una población de ADNc. En el caso de que se utilice el presente método de secuenciación para secuenciar directamente una molécula diana de ácidos nucleicos contenida en una población de ADNc a partir de un ARN total, dicho método comprende las etapas siguientes:

(a) poner en contacto una población de ARNm con un cebador oligonucleótido dT que se hibrida con una cola poli-A de los ARNm bajo condiciones suficientes para que se produzca la síntesis enzimática de ácido desoxirribonucleico controlada por molde.

(b) transcribir inversamente los ARNm a los que se hibrida el cebador oligonucleótido dT para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a los ARNm a los que se hibrida el cebador oligonucleótido dT,

(c) sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria a la primera cadena de ADNc que debe secuenciarse mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando el oligonucleótido de doble especificidad a modo de cebador de secuenciación, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a la primera cadena de ADNc para permitir la hibridación con la misma, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la primera cadena de ADNc para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con la primera cadena de ADNc, en el que el apareamiento en la reacción de síntesis se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a T_m reducida, y (b) determinar una secuencia de nucleótidos de la primera cadena de ADNc sintetizada.

V. Aplicación de detección de moléculas de ácidos nucleicos con diversidad genética

En otro aspecto, se da a conocer un método para detectar una molécula de ácidos nucleicos con diversidad genética mediante una reacción de extensión dependiente de molde de un oligonucleótido de doble especificidad, que comprende las etapas siguientes:

(a) apareamiento del oligonucleótido de doble especificidad con una molécula molde de ácidos nucleicos, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada

5 presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a Tm reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, en donde la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, la parte de separación presenta la Tm más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y la parte 3' de especificidad a Tm reducida se aparean con el ácido nucleico molde, en la que el apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida, y el apareamiento se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o la parte 3' de especificidad a Tm reducida presenta una o más bases desapareadas a su sitio diana, y (b) extensión del oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde. (c) detección de la extensión dependiente de molde del oligonucleótido de doble especificidad.

15 Debido a que dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria se lleva a cabo según los presentes métodos de síntesis de secuencias de ácidos nucleicos comentadas anteriormente, las descripciones comunes han sido omitidas con el fin de evitar complejidad en la presente memoria que conlleve una redundancia excesiva.

20 Dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DS tal como se da a conocer en la presente memoria puede proporcionar un método mejorado para sintetizar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos con diversidad genética mediante una reacción de extensión dependiente de molde que incluye etapas de apareamiento y extensión. En particular, la detección de una secuencia diana de ácidos nucleicos con diversidad genética puede conseguirse mediante la repetición del procedimiento de la reacción de extensión dependiente de molde en la que tras las etapas de apareamiento y extensión se realiza una etapa de desnaturalización.

El presente método se basa en la tolerancia al desapareamiento del oligo de DS.

30 Se ha informado de diversidad genética en diversos genomas. Este fenómeno se ha considerado un obstáculo a la detección de un gen o genoma de interés sin errores. El propósito de la presente invención es proporcionar un enfoque para superar dichos problemas convencionales mediante la utilización del oligo de DS con tolerancia al desapareamiento. El oligo de DS con una secuencia diana puede hibridarse con varias secuencias diana que muestran diversidad genética, resultando en el buen funcionamiento de la amplificación y detección de las secuencias de nucleótidos de interés. En otras palabras, el oligo de DS desarrollado originalmente para incrementar drásticamente la especificidad de apareamiento e hibridación también pueden utilizarse en procedimientos que requieran tolerancia al desapareamiento en los que las condiciones de hibridación o restrictivas se ajustan convenientemente.

40 Con el fin de proporcionar el oligo de DS que muestra tolerancia al desapareamiento, debe diseñarse a partir de una región conservada de las moléculas de ácidos nucleicos generadas mediante la alineación de todas las secuencias de nucleótidos disponibles. La expresión "región conservada" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un segmento de secuencia de nucleótidos de un gen o una secuencia de aminoácidos de una proteína que es significativamente similar en diversas secuencias de nucleótidos diferentes de un gen. Dicha expresión se utiliza intercambiablemente con la expresión "secuencia conservada".

50 En una realización preferente, la secuencia más conservada dentro de la región conservada se encuentra localizada hacia el extremo 3' del oligo de DS, mientras que la secuencia menos conservada se encuentra situada en la parte de separación. La parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o la parte 3' de especificidad a Tm reducida, preferentemente la parte 5' de especificidad a Tm elevada, puede presentar una o más, preferentemente una a tres, más preferentemente una o dos bases desapareadas con su diana debido a la tolerancia al desapareamiento del oligo de DS.

55 Para imponer tolerancia al desapareamiento al oligo de DS, resultan importante las condiciones de la hibridación, en particular la temperatura de hibridación. El apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida, aunque el apareamiento de todas las partes se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o de la parte 3' de especificidad a Tm reducida presente una o más bases desapareadas con su sitio diana.

60 Preferentemente, la temperatura de hibridación es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente de entre 45°C y 68°C, y todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C.

Según una realización preferente, el presente método se lleva a cabo de acuerdo con la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR).

La etapa de detección del presente método puede llevarse a cabo mediante una multitud de técnicas convencionales. Por ejemplo, la detección del producto de la extensión dependiente de molde puede llevarse a cabo fácilmente mediante electroforesis en gel convencional en el caso de que el presente método se lleve a cabo de una manera repetida para generar productos suficientes para ser detectados en un gel. En el caso de los materiales marcados, incluyendo los detectables mediante medición espectroscópica, fotoquímica, bioquímica, bioelectrónica, inmunológica, electrónica y química, puede llevarse a cabo una medición adecuada para detectar la presencia de la extensión dependiente de molde.

La diversidad genética se observa y se genera más frecuentemente en el genoma vírico (Nathalie B. *et al.*, Journal of Clinical Microbiology 42:3532, 2004; Tersa C. *et al.*, Journal of Infectious Diseases 185:1660, 2002; Takashi E. *et al.*, Journal of Clinical Microbiology 42:126, 2004; y Elizabeth R. *et al.*, Clinical Infectious Diseases 32:1227, 2001). A este respecto, resulta preferente que la molécula de ácidos nucleicos con diversidad genética que debe detectarse sea un ácido nucleico de un virus que muestre diversidad genética. Por ejemplo, en el caso de que la presente invención se aplica a la detección de metaneumovirus humanos que muestran diversidad genética mediante PCR, el conjunto de cebadores más preferible diseñado para presentar la estructura de los oligos de DS se indica en las secuencias SEC ID nº 39 (para el cebador 5') y nº 40 (para el cebador 3') o las secuencias SEC ID nº 39 y nº 41 (para el cebador 3').

VI. Aplicación a la detección de una secuencia de nucleótidos diana utilizando oligos de DS inmovilizados en una micromatriz

La presente aplicación es un nuevo procedimiento para detectar una secuencia de nucleótidos diana mediante la repetición de una reacción dependiente de molde en una micromatriz con oligos de DS inmovilizados.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que comprende las etapas siguientes:

(a) extensión de un oligonucleótido de doble especificidad a modo de sonda inmovilizada sobre un sustrato, que comprende por lo menos un ciclo de hibridación, una extensión dependiente de molde y una desnaturalización, en la que la hibridación se lleva a cabo mediante la puesta en contacto del oligonucleótido de doble especificidad con la muestra de ácidos nucleicos, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia de nucleótidos diana para permitir la hibridación con la misma, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a T_m reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia de nucleótidos diana para permitir la hibridación con la misma; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con la secuencia de nucleótidos diana, en la que la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones en las que la hibridación no se produce únicamente con la parte 3' de especificidad a T_m reducida, y

(b) análisis de las observaciones de extensión dependiente de molde.

En la fig. 4 se ilustra una representación esquemática de detección de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos mediante la utilización de la micromatriz con oligos de DS inmovilizados.

Dicho procedimiento que utiliza los oligos de DS puede llevarse a cabo bajo condiciones de hibridación adecuadas determinadas rutinariamente mediante procedimientos de optimización. Algunas condiciones, tales como la temperatura, la concentración de los componentes, los tiempos de hibridación y de lavado, los componentes tamponadores y su pH y fuerza iónica, pueden modificarse dependiendo de diversos factores, entre ellos la longitud y contenido de GC del oligonucleótido y de la secuencia de nucleótidos diana. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un oligonucleótido relativamente corto, resulta preferible que se adopten condiciones de baja astringencia. Las condiciones detalladas de hibridación pueden encontrarse en Joseph Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag, New York Inc., N.Y., 1999.

Los oligos de DS se inmovilizan sobre un sustrato. Un sustrato preferible incluye soportes sólidos o semisólidos, tales como membranas, filtros, chips, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, macromoléculas, micropartículas y tubos capilares. Dicha inmovilización puede producirse mediante unión química o unión covalente mediante radiación ultravioleta. En una realización de la presente invención, los oligos de DS se unen a una superficie de cristal modificada para contener compuestos epoxi o grupos aldehído o a una superficie recubierta con polilisina. Además, los oligos de DS se unen a un sustrato mediante moléculas conectoras

(por ejemplo oligómero de etilenglicol y diamina). Los oligos de DS inmovilizados pueden fabricarse para producir una o más matrices para una aplicación dada mediante tecnologías de fabricación convencionales, tales como la fotolitografía, la impresión con chorro de tinta, la microimpresión mecánica y derivados de los mismos.

5 Según el presente método, los dNTPs utilizados en la etapa de extensión preferentemente se marcan. Para el marcaje, se utilizan materiales detectables mediante medición espectroscópica, fotoquímica, bioquímica, bioelectrónica, inmunoquímica, electrónica o química. Por ejemplo, entre los marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos como P³² y S³⁵, compuestos quimioluminiscentes, marcadores espectroscópicos, tales como marcadores de fluorescencia y pigmentos, y marcajes magnéticos. Entre los pigmentos se incluyen, por ejemplo, aunque sin limitación, pigmento quinolina, pigmento triarilmetano, ftaleína, pigmento azo y pigmento cianina. Entre los marcadores de fluorescencia se incluyen, aunque sin limitación, fluoresceína, ficoeritrina, rodamina, lisamina, Cy3 y Cy5 (Farmacia). El marcaje se lleva a cabo según diversos métodos conocidos de la técnica.

15 Las secuencias de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos se hibridan con los oligos de DS a modo de sondas inmovilizadas sobre un sustrato, preferentemente un soporte sólido, y a su vez los oligos de DS hibridados con secuencias de nucleótidos diana se extienden utilizando dNTPs, preferentemente dNTPs marcados fluorescentemente y ADN polimerasa de un modo dependiente de molde. La etapa (a) preferentemente se repite para llevar a cabo reacciones de hibridación en la medida en que la totalidad o la mayoría de los oligos de DS se hibridan con secuencias de nucleótidos diana, proporcionando resultados del análisis de hibridación más reproducibles.

20 La producción de hibridación se verifica mediante diversos métodos conocidos de la técnica, dependiendo de los tipos de marcaje utilizados. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia, preferentemente la microscopía confocal de fluorescencia, se utiliza para los marcajes fluorescentes, y la intensidad de la señal detectada con dichos instrumentos se incrementa en proporción al grado de hibridación. Los microscopios de fluorescencia, en general, están dotados de un dispositivo de escaneo que construye una imagen bidimensional cuantitativa de la intensidad de hibridación. La intensidad de la señal detectada con dichos instrumentos se incrementa en proporción al grado de hibridación y del grado de extensión dependiente de molde.

25 A continuación se describe la presente invención en mayor detalle mediante ejemplos. Dichos ejemplos son ilustrativos y el alcance de la presente invención se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1: especificidad de la PCR utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

35 Los oligonucleótidos de DS desarrollados en la presente invención se aplicaron como cebadores con el fin de amplificar secuencias de nucleótidos diana de los genes IL-19 e IL-1beta de la familia de las citoquinas de ratón. En la presente memoria se describen el procedimiento y los resultados de la amplificación de las secuencias de nucleótidos diana de IL-19 e IL-1beta utilizando cebadores de DS.

40 Se seleccionaron las secuencias de cebadores convencionales siguientes y se utilizaron para la comparación con los oligonucleótidos de DS respecto a la especificidad de la PCR:

Los cebadores convencionales específicos para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:
 IL19-5'-0 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAGTCTCTAGGAGAACT-3' (SEC ID n° 1) y
 IL19-3'-0 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGCTTTACAATAAGTTAG-3' (SEC ID n° 2).

45 Los cebadores convencionales específicos para IL-1beta utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:
 IL1b-5'-0 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCAATACCCAAAGAAG-3' (SEC ID n° 3) y
 IL1b-3'-0 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGACCAATTCATCCC-3' (SEC ID n° 4).

50 Los oligonucleótidos de DS de la presente invención se aplicaron a dichas secuencias de cebador convencional para demostrar que los oligonucleótidos de DS pueden superar los problemas principales planteados por estas secuencias de cebador convencional, tales como la generación de ruido de fondo y de productos inespecíficos.

55 Los cebadores de DS siguientes comprenden secuencias idénticas a los cebadores convencionales anteriormente indicados, excepto por la parte de separación, que presenta un conector polidesoxiinosina [poli(dI)] entre la parte 5' y la parte 3'. Los cebadores de DS están diseñados para comprender una parte 5' de especificidad a Tm elevada y una parte 3' de especificidad a Tm reducida de manera que la Tm de la parte 5' de especificidad a Tm elevada sea superior a la de la parte 3' de especificidad a Tm reducida, mientras que la parte de separación presenta la Tm más baja de las tres partes.

60 Los cebadores de DS para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:
 IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAIIIIITAGGAGAACT-3' (SEC ID n° 5) y
 IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (SEC ID n° 6),

en los que I es desoxiinosina.

Los cebadores de DS para IL-1beta utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:
 5 IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAAGAAG-3' (SEC ID n° 7) y
 IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITTCATCCC-3' (SEC ID n° 8),
 en los que I es desoxiinosina.

La amplificación por PCR dirigida se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (50 ng) del ADN genómico aislado a partir de tejidos de placenta de ratón cepa ICR, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de cebador 5' de DS o convencional (10 µM), 1 µl de cebador 3' de DS o convencional (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR resultantes también pudieron detectarse en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radioactivos, tales como la tinción con plata (Gottschlich *et al.*, Res. Commun. Mol. Path. Pharm. 97:237-240, 1997; Kociok N. *et al.* Mol. Biotechnol. 9:25-33, 1998) o mediante la utilización de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (Bauer D. *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:4272-4280, 1993; Ito T. *et al.*, FEBS Lett. 351:231-236, 1994; Luehrsen K.R. *et al.*, BioTechniques 22:168-174, 1997; Smith N.R. *et al.*, BioTechniques 23:274-279, 1997), y la utilización de cebadores biotinilados (Korn B. *et al.*, Hum. Mol. Genet. 1:235-242, 1992; Tagle D.A. *et al.*, Nature 361:751-753, 1993; Rosok O. *et al.*, BioTechniques 21:114-121, 1996).

Tal como se muestra en la fig. 5, las amplificaciones mediante PCR dirigida de los genes IL-1b e IL-19 de la familia de las citoquinas utilizando los conjuntos de cebadores IL1b-5' e IL1b-3', e IL19-5' e IL19-3', generan una única banda que corresponde al tamaño esperado de 550 pb para IL-1beta (carril 2) y al tamaño esperado de 500 pb para IL-19 (carril 4), respectivamente. La clonación y análisis de secuencia posteriores de los clones confirmaron que las bandas eran de los fragmentos IL-1beta e IL-19. En contraste, los conjuntos de cebadores convencionales (IL19-5'-0 e IL19-3'-0; IL1b-5'-0 e IL1b-3'-0), que no contienen el [poli(dI)], produjeron productos no específicos (fig. 5, carriles 1 y 3). Estos resultados indican que los cebadores de DS diseñados para presentar tres partes con diferente Tm (parte 5' de especificidad a Tm elevada, parte 3' de especificidad a Tm reducida y parte de separación) pueden superar los problemas principales planteados por las secuencias de cebador convencionales, tales como el fondo y los productos inespecíficos, e incrementar notablemente la especificidad de la PCR.

EJEMPLO 2: evaluación de la especificidad de la PCR utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Los oligonucleótidos de doble especificidad se caracterizan por elevadas especificidad de hibridación y tolerancia al desapareamiento, que surgen de su estructura única, dependientes de la astringencia de la hibridación. La elevada especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos de DS se consigue bajo condiciones de elevada stringencia en las que tanto la parte 5' como la 3' se encuentran apareadas con el molde. Entretanto, la tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de DS se consigue bajo condiciones de astringencia en las que tanto la parte 5' como la 3' se encuentran apareadas con el molde a pesar de la presencia de uno o más pares de bases, aunque un número limitado, desapareados.

La doble especificidad de los oligonucleótidos de DS desarrollados según la presente invención se evaluó en términos de especificidad de hibridación y tolerancia al desapareamiento mediante la 3'-RACE de un nuevo gen, DEG10, el cual se ha identificado que se expresa en la placenta del ratón (Kim Y.J. *et al.*, Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels, BioTechniques 36:424-434, 2004; XM_129567). Para esta evaluación, se sustituyeron unos cuantos nucleótidos en ambas partes por otros nucleótidos de manera que se encontrasen desapareados con la secuencia molde de la diana.

Los cebadores de DS 5' específicos de DEG10 utilizados en el Ejemplo fueron:
 55 DEG10-5'-108: 5'-TG TAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCGATG-3' (SEC ID n° 9),
 DEG10-5'-103: 5'-TG TAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTGCCATC-3' (SEC ID n° 10),
 DEG10-5'-102: 5'-TG TAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCCCATC-3' (SEC ID n° 11),
 DEG10-5'-101: 5'-TG TAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCCCATG-3' (SEC ID n° 12),
 DEG10-5'-158: 5'-TG TACTTATGCGTATCGTCCIIIIICTCCGATG-3' (SEC ID n° 13),
 60 DEG10-5'-138: 5'-TG TACTTATGCGTTTCCGTCCIIIIICTCCGATG-3' (SEC ID n° 14) y
 DEG10-5'-128: 5'-TG TAGTTATGGGTATCCTCCIIIIICTCCGATG-3' (SEC ID n° 15),
 en los que los nucleótidos sustituidos se encuentran subrayados y en negrita, y en donde I es desoxiinosina.

A. Mejora de la especificidad de la PCR bajo condiciones de alta astringencia

Se aislaron ARN totales procedentes de tejidos de placenta de 17,5 dpc (E17,5) de la cepa ICR de ratón y se utilizaron para la síntesis de primeras cadenas de ADNc utilizando transcriptasa inversa, tal como se ha descrito anteriormente (Hwang I.T. *et al.*, Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* 35:1180-1184, 2003). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa utilizando los ARN totales durante 1,5 horas a 42°C en un volumen de reacción de 20 µl compuesto de lo siguiente: 3 µg de ARN total, 4 µl de 5x tampón de reacción (Promega, USA), 5 µl de dNTPs (cada uno 2 mM), 2 µl de cebador de síntesis de ADNc 10 µM (oligo (dT)₂₀-adaptador), 0,5 µl de inhibidor de ARNasa (40 unidades/µl, Promega) y 1 µl de transcriptasa inversa (200 unidades/µl, Promega). Se diluyeron primeras cadenas de ADNc mediante la adición de 180 µl de H₂O ultrapurificada. El cebador de síntesis de ADNc oligo (dT)₁₈-ACP1 es: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(T)₁₈-3', en el que I es desoxiinosina.

La 3'-RACE de DEG10 se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores de DS específicos para DEG10 (10 µM), 1 µl de oligo (dT)₁₅-ACP2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C. El oligo (dT)₁₅-ACP2 es: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(T)₁₅-3', en el que I es desoxiinosina.

B. Tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de DS

Se utilizaron los cebadores de DS, molde y condiciones de PCR de la muestra para la 3'-RACE de DEG10 utilizada en el Ejemplo 2A excepto por la temperatura de hibridación. La amplificación por PCR se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: un ciclo de 94°C durante 5 minutos, 60°C durante 3 minutos y 72°C durante 3 minutos, seguido de 29 ciclos de 94°C durante 40 s, 65°C durante 1 minuto y 72°C durante 20 segundos, y un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C.

Como resultado, la fig. 6A muestra la elevada especificidad de hibridación de los cebadores oligonucleótidos de DS mediante la 3'-RACE de DEG10. El cebador de DS 5' específico de DEG10 intacto (DEG10-5'-108) generó un producto esperado de 677 pb de la 3'-RACE de DEG10 (carril 1). En contraste, los demás cebadores (DEG10-5'-103, DEG10-5'-102, DEG10-5'-101, DEG10-5'-158, DEG10-5'-138 y DEG10-5'-128) con secuencias desapareadas en la parte 5' o en la parte 3' no generaron ningún producto: el desapareamiento de tres (carril 2), dos (carril 3) o una (carril 4) base en la parte 3'; el desapareamiento de cinco (carril 5), tres (carril 6) o dos (carril 7) bases en la parte 5'.

Estos resultados demuestran que la doble especificidad de los cebadores de DS pueden discriminar las bases desapareadas no sólo en el extremo 3' sino también en el extremo 5' bajo dichas condiciones de elevada astringencia.

En general, la región de los cebadores que debería ser perfectamente complementaria al molde es el extremo 3', debido a que este extremo es la región que extiende la ADN polimerasa y es, por lo tanto, la más importante para garantizar que se produce la hibridación con la secuencia diana correcta. Entre tanto, el extremo 5' de los cebadores resulta menos importante para determinar la especificidad de hibridación con la secuencia diana y puede ser modificado para portar secuencias adicionales, tales como sitios de restricciones y secuencias promotoras que no son complementarias al molde (McPherson M.J., Moller S.G., PCR BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, N.Y., 2000). En contraste con ellas, las excepcionales ventajas de los cebadores de DS quedan demostradas por la doble especificidad debida su estructura única, que permite la discriminación de bases desapareadas en el extremo 5', así como en el extremo 3'.

La fig. 6B muestra un ejemplo de la tolerancia al desapareamiento de los cebadores oligonucleótidos de DS mediante la 3'-RACE de DEG10. Aunque los cebadores de DS (DEG10-5'-108, DEG10-5'-101, DEG10-5'-128 y DEG10-5'-138) que presentan pocos o ningún nucleótido desapareado en las partes de extremo 5' ó 3' de los mismos todavía generaron un producto esperado de 677 pb de la 3'-RACE de DEG10 (carriles 1, 4, 6 y 7). En contraste, los demás cebadores (DEG10-5'-103, DEG10-5'-102 y DEG10-5'-158), con más nucleótidos desapareados en las partes 5' ó 3' de los mismos no generaron ningún producto (carriles 2, 3 y 5). Estos resultados indican que los cebadores de DS también pueden aplicarse en amplificaciones de diversas secuencias de nucleótidos que requieren tolerancia al desapareamiento.

En resumen, estos resultados apoyan los principios siguientes de los cebadores de DS:

1) únicamente en el caso de que la hibridación se produzca en tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como

en la parte 3' de especificidad a Tm reducida, el cebador de DS se extiende para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde (carril 2); sin embargo, 2) en el caso de que la hibridación se produzca únicamente en la parte 5' de especificidad a Tm elevada y no en la parte 3' de especificidad a Tm reducida, el cebador de DS no se extiende sintetizando una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde (carriles 2 a 4), y 3) aunque la secuencia de la parte 3' de especificidad a Tm reducida presente una correspondencia perfecta con el molde, la hibridación de únicamente la parte 3' de especificidad a Tm reducida no se produce bajo condiciones de astringencia elevada (carriles 5 a 7). Con respecto a la parte hibridante, el cebador de DS es claramente diferente del cebador de control de hibridación (ACP), que se extiende únicamente mediante hibridación de la parte de extremo 3' en una etapa inicial de la PCR (Hwang I.T. *et al.*, Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification, *BioTechniques* 35:1180-1184, 2003).

EJEMPLO 3: discriminación de bases individuales utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Con el fin de demostrar la doble especificidad de los oligonucleótidos de DS para la discriminación de bases individuales, se amplificaron los ADNc de los genes Pxs1 y Pxs2 de la familia homeobox específica de placenta, utilizando cebadores convencionales o cebadores de DS. La identidad global de secuencia entre los dos ADNc de Pxs era de 91% a nivel de nucleótidos (Han Y.J. *et al.*, Identification and characterization of Pxs2, a novel member of the Pxs (placenta-specific homeobox) family, *Gene* 241: 149-155, 2000). Se diseñaron los cebadores 5' para distinguir Pxs1 y Pxs2 mediante discriminación de una o dos bases (fig. 7A). Sin embargo, el cebador 3' se diseñó para presentar una secuencia conservada para ambos ADNc de Pxs. Las secuencias de cebador convencional y de DS específicas para Pxs1 y Pxs2 eran:

Pxs1-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGTGGTGGTCTTCT~~AGCT~~-3' (SEC ID nº 16),
 Pxs2-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGTGGTGGTCTTCT~~GCC~~-3' (SEC ID nº 17),
 Pxs1-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGTGGTGGTCTTCT~~AGCT~~-3' (SEC ID nº 18),
 Pxs2-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGTGGTGGTCTTCT~~GCC~~-3' (SEC ID nº 19),
 Pxs1-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAAT~~GTGA~~-3' (SEC ID nº 20),
 Pxs2-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAAT~~CTGA~~-3' (SEC ID nº 21),
 Pxs1-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAAI~~GIGA~~-3' (SEC ID nº 22),
 Pxs2-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAAI~~CIGA~~-3' (SEC ID nº 23) y
 Pxs-3'-2: 5'-TTCATCCACACCCATCCATCIIIIAGATCCCT-3' (SEC ID nº 24),
 en los que los nucleótidos específicos de Pxs1 ó de Pxs2 se encuentran subrayados y en negrita.

A. Síntesis de primera cadena de ADNc

Como material de partida para la 3'-RACE se utilizó la primera cadena de ADNc de placenta de ratón sintetizada en el Ejemplo 2 y una PCR dirigida del ADNc de Pxs.

B. 3'-RACE de Pxs1 y Pxs2 utilizando cebadores de DS específicos de Pxs1 y de Pxs2

La 3'-RACE de Pxs1 y Pxs2 se llevó a cabo en un volumen final de gel que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores convencionales o de DS específicos para 5'-Pxs1 ó 5'-Pxs2 (10 µM), 1 µl de oligo (dT)₁₅-ACP2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

C. Amplificación dirigida de los ácidos nucleicos de Pxs1 y Pxs2 utilizando cebadores de DS específicos para Pxs1 y Pxs2

La PCR dirigida de Pxs1 y Pxs2 se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores convencionales o de DS específicos para 5'-Pxs1 ó 5'-Pxs2 (10 µM), 1 µl de oligo Pxs-3'-2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

Como resultado, la fig. 7B muestra los productos de la 3'-RACE y la PCR dirigida generados por los cebadores específicos para 5'-Pxs1 ó Pxs2. Debido a que los dos ADNc de Pxs difieren entre sí por una delección o inserción de 29 pb hacia su extremo 3', se esperaba que los productos de tamaño que difería en 29 pb fueran amplificados en su 3'-RACE. La 3'-RACE del ADNc de Pxs1 utilizando los cebadores de DS específicos para Pxs1 ó Pxs2, Pxs1-5'-41 y Pxs2-5'-41, generaron, cada uno, una única banda que correspondía al tamaño esperado de 311 pb (carril) y 282 pb (carril 2), respectivamente. El posterior análisis de la secuencia de los productos generados por la 3'-RACE confirmó que los cebadores específicos para 5'-Pxs1 y Pxs2 amplificaron los ADNc de Pxs1 y Pxs2, respectivamente. En

contraste, los cebadores convencionales (Psx1-5'-40 y Psx2-5'-40), que no satisfacían los principios de los oligonucleótidos de DS, no distinguieron entre los dos ADNc de Psx (carriles 3 y 4).

5 Estos resultados indican que los cebadores de DS según la presente invención podían discriminar el desapareamiento de una única base. Por lo tanto, los oligonucleótidos de DS pueden aplicarse a la identificación de mutaciones puntuales o al genotipado de polimorfismos de un único nucleótido.

10 **EJEMPLO 4: secuenciación directa de un ADNc diana a partir de un pool de ADNc utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)**

10 La mayoría de intentos para identificar y aislar un nuevo ADNc resultan en la obtención de clones que representan únicamente una parte de la secuencia del ARNm. Tras identificar la secuencia parcial, el resto del transcrito con frecuencia puede obtenerse mediante un cribado típico de la biblioteca de ADNc o mediante métodos basados en la PCR, tales como la RACE (amplificación rápida de extremos del ADNc), seguido de la secuenciación del ADNc obtenido. De esta manera, todos los métodos actuales son una etapa previa necesaria para obtener la información de secuencia del resto del transcrito. En el caso de que la información de secuencia que falta se obtenga directamente a partir de una población de ADNc generados a partir de una célula diana, estas laboriosas etapas previas necesarias pueden omitirse por completo y la secuencia del ADNc diana puede determinarse directamente a partir de una muestra biológica cruda.

20 Los oligonucleótidos de DS de la presente invención se aplicaron como cebadores a la secuenciación directa de los ADNc del gen Psx de la familia homeobox específico de placenta de ratón, utilizando el pool de primeras cadenas de ADNc de placenta. El procedimiento y los resultados de la secuenciación directa de los ADNc del gen específico de placenta procedente del pool de ADNc de placenta se describen en la presente memoria. Se utilizaron los mismos cebadores de DS específicos de 5' Psx utilizados en el Ejemplo 3: Psx1-5'-11, Psx2-5'-11, Psx1-5'-41 y Pyx2-5'-41.

30 A. Síntesis de primera cadena de ADNc

La primera cadena de ADNc de placenta de ratón sintetizada en el Ejemplo 2 se utilizó como molde para la secuenciación directa de los ADNc de Psx.

B. Secuenciación directa del ADNc de Psx a partir del pool de ADNc de placenta utilizando el cebador de DS específico para Psx

35 Se llevó a cabo la reacción de secuenciación cíclica en un volumen final de 20 μ l que contenía 13 μ l (150 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 μ l de la mezcla de reacción ABI PRISM Big Dye Terminator (Applied Biosystems, USA), 3 μ l de 5x tampón de reacción de secuenciación (Applied Biosystems) y 1,6 μ l de uno de los cebadores de DS específicos para 5'-Psx1 ó 5'-Psx2 (1 μ M); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 40-50 ciclos de 10 segundos a 94°C, 3 minutos a 50-60°C y 4 minutos a 60-65°C. Los productos de secuenciación se purificaron del modo siguiente: 1) adición de 2 μ l de acetato sódico 3 M (pH 4,6) y 50 μ l de EtOH al 100% frío, 2) mantenimiento a -75°C durante 30 minutos, 3) centrifugación durante 15 a 30 minutos a 13.000 g y eliminación del sobrenadante, 4) lavado con 200 μ l de EtOH al 70%, 5) centrifugación durante 15 a 30 minutos a 13.000 g y eliminación cuidadosa del sobrenadante y secado. El pellet se resuspendió en 10 μ l de HiDi formamida inmediatamente antes de analizar el producto de secuenciación en un analizador génico ABI PRISM 3100.

45 Inesperadamente, los cebadores de DS de Psx secuenciaron con precisión sus ADNc específicos para Psx. En otras palabras, el cebador de DS específico para Psx1 (Psx1-5'-41) secuenció únicamente el ADNc de Psx1 y el cebador de DS específico para Psx2 (Psx2-5'-41) secuenció únicamente el ADNc de Psx2 (fig. 8). La región delecionada de 29 pb en Psx2 se muestra con una raya negra. En contraste, los cebadores convencionales (Psx1-5'-40 y Psx2-5'-40), que no satisfacían los principios de los oligonucleótidos de DS, no distinguieron entre los dos ADNc de Psx.

50 Estos resultados indican que los cebadores de DS pueden discriminar desapareamientos de una sola base incluso en la secuenciación cíclica, así como en la amplificación por PCR.

55 **EJEMPLO 5: PCR multiplex utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)**

Con el fin de demostrar la aplicación de los cebadores oligonucleótidos de DS en la PCR multiplex, se amplificaron nueve genes diferentes de la familia de las citoquinas utilizando cebadores de DS. En la presente memoria se describen el procedimiento y resultados para la amplificación mediante PCR multiplex utilizando cebadores de DS. Se diseñaron los cebadores de DS específicos para genes de la familia de las citoquinas con el fin de generar una escalera de 50 pb mediante la utilización de la secuencia de exón más larga de cada gen de citoquina.

Los cebadores de DS para IL-3 utilizados en el Ejemplo (200 pb) fueron:

IL3-5' 5'-GCTGCCAGGGGTCTTCATTCIIIICTGGATGA-3' (SEC ID nº 25) y
IL3-3' 5'-GGCCATGAGGAACATTCAGAIIIIIIGGTGCTCT3' (SEC ID nº 26).

5 Los cebadores de DS para IL-15 utilizados en el Ejemplo (250 pb) fueron:
IL15-5' 5'-ATGTAGCAGAATCTGGCTGCIIIIIATGTGAGG-3' (SEC ID nº 27) y
IL15-3' 5'-ATGTGATCCAAGTGGCTCATIIIIICCTTGTAGG-3' (SEC ID nº 28).

10 Los cebadores de DS para IL-18 utilizados en el Ejemplo (300 pb) fueron:
IL18-5' 5'-AGGAAATGGATCCACCTGAAIIIIITGATGATATA-3' (SEC ID nº 29) y
IL18-3' 5'-ATGGAAATACAGGCGAGGTCTIIIIAAGGCGCA-3' (SEC ID nº 30).

15 Los cebadores de DS para IL-25 utilizados en el Ejemplo (350 pb) fueron:
IL25-5' 5'-AGCTCTCCAAGCTGGTGATCIIIIICAAGGCGG-3' (SEC ID nº 31) y
IL25-3' 5'-GAGCTGCCCTGGATGGGGTIIIIIGTGGTCCT-3' (SEC ID nº 32).

Los cebadores de DS para IL-2 utilizados en el Ejemplo (400 pb) fueron:
IL2-5' 5'-CTCTGACAACACATTTGAGTGCIIIIICGATGATGAG-3' (SEC ID nº 33) y
IL2-3' 5'-GTGCTGTCTTAAAAATGACAGAIIIIIIGAGCTTATTT-3' (SEC ID nº 34).

20 Los cebadores de DS para IL-6 utilizados en el Ejemplo (450 pb) fueron:
IL6-5' 5'-CCAATGCTCTCCTAACAGATAAIIIIAGTCACAGAA-3' (SEC ID nº 35) y
IL6-3' 5'-AGGTAACTTATACATTCGAAGAAIIIIITGGCTAGG-3' (SEC ID nº 36).

25 Los cebadores de DS para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:
IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAIIIIITAGGAGAACT-3' (SEC ID nº 5) y
IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (SEC ID nº 6).

30 Los cebadores de DS para IL-1beta utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:
IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAAGAAG-3' (SEC ID nº 7) y
IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITTCATCCC-3' (SEC ID nº 8).

35 Los cebadores de DS para IL-10 utilizados en el Ejemplo (600 pb) fueron:
IL10-5' 5'-AAGGCCATGAATGAATTTGAIIIIIITCATCAACTG-3' (SEC ID nº 37) y
IL10-3' 5'-TGACAGTAGGGGAACCCTCTIIIIIGCTGCAGG-3' (SEC ID nº 38).

A. PCR monoplex utilizando un conjunto de cebadores de DS específicos de genes de la familia de las citoquinas

40 La PCR dirigida única para cada gen de la familia de las citoquinas se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (50 ng) de ADN genómico de ratón, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de cada cebador 5' de DS específico de genes de la familia de las citoquinas (10 µM), 1 µl de cada cebador 3' de DS específico de genes de la familia de las citoquinas (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

45 B. PCR multiplex utilizando nueve conjuntos de cebadores de DS específicos de genes de la familia de las citoquinas

50 La amplificación por PCR multiplex se llevó a cabo en un único tubo mediante la utilización de 9 conjuntos de cebadores de DS específicos de genes de la familia de las citoquinas; la mezcla de reacción presentaba un volumen final de 50 µl que contenían 100 ng de ADN genómico de ratón, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 5 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de cada cebador 5' de DS específico de genes de la familia de las citoquinas (0,2 a 5 µM), 1 µl de cada cebador 3' de DDS específico de genes de la familia de las citoquinas (0,5 a 5 µl) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las condiciones de PCR eran: un ciclo de 94°C durante 5 minutos, 50°C durante 3 minutos y 72°C durante 3 minutos, seguido de 29 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 40 segundos, y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C.

60 Tal como se muestra en la fig. 9, la amplificación por PCR multiplex genera múltiples bandas que corresponden a los tamaños esperados de 200 a 600 pb para 9 productos de genes de citoquina diferentes (fig. 4, carril 1). Cada amplificación por PCR monoplex generó una única banda que correspondía al tamaño esperado de 200 pb para IL-3 (fig. 4, carril 2), 250 pb para IL-15 (fig. 4, carril 3), 300 pb para IL-18 (fig. 4, carril 4), 350 pb para IL-25 (fig. 4, carril 5), 400 pb para IL-2 (fig. 4, carril 6), 450 pb para IL-6 (fig. 4, carril 7), 500 pb para IL-19 (fig. 4, carril 8), 550 pb para

IL-1beta (fig. 4, carril 9) y 600 pb para IL-10 (fig. 4, carril 10), respectivamente.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, pudo apreciarse que los cebadores de DS desarrollados en la presente invención pueden aplicarse con éxito a la PCR multiplex. La estructura única de los oligonucleótidos de DS permite superar el problema común de cualquier PCR multiplex convencional, es decir, la interferencia entre cebadores y la formación de dímeros.

EJEMPLO 6: detección de metaneumovirus humano utilizando la tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Con el fin de demostrar la aplicación de los cebadores oligonucleótidos de DS en la tolerancia al desapareamiento, se aplicaron cebadores de DS a la detección de metaneumovirus humanos (MPVh) en muestras clínicas. En la presente memoria se describen el procedimiento y resultados para la detección del metaneumovirus humano utilizando cebadores de DS. El presente Ejemplo no debe interpretarse como limitativo de las aplicaciones de la invención a la detección del virus específico.

Los cebadores de DS se diseñaron basándose en la región conservada del gen de glucoproteína de fusión (F) generado mediante la alineación de secuencias de todos los aislados de MPVh (ver la Tabla 1). Para tolerar la diversidad genética de dichos aislados, los cebadores se diseñaron basándose en los criterios siguientes: (a) las regiones conservadas deben presentar una longitud de por lo menos 30 nucleótidos a pesar de la presencia de uno o más pares de bases, aunque un número limitado, de desapareadas (Tabla 1); (b) la mayoría de secuencias desapareadas dentro de las regiones conservadas preferentemente se localizan en la parte de separación del cebador de DS (por ejemplo MPVh 5'-585, MPVh 3'-698 y MPVh 3'-1007); (c) en caso contrario, los nucleótidos desapareados se localizan en la parte de extremo 5', algunos de los cuales podrían sustituirse por bases universales, tales como las desoxiinosinas (por ejemplo MPVh 3'-698 y MPVh 3'-1007), y (d) pueden sustituirse uno o dos nucleótidos desapareados por uno o más nucleótidos degenerados o bases universales (por ejemplo MPVh 3'-1007).

TABLA 1. Cebadores oligonucleótidos de DS específicos de MPVh en la región conservada del gen (F) de la glucoproteína de fusión de todos los aislados de MPVh disponibles

Cebador	Secuencia	Nº de aislados
Secuencias víricasAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>GGTTCT</u> AAATGTTG.....	1
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>ATTCT</u> AAATGTTG.....	3
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>ATTCT</u> AAATGTTG.....	4
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>ATTCT</u> AAATGTTG.....	1
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>ATTCT</u> AAATGTTG.....	9
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG <u>TTTCT</u> AAATGTTG.....	14
Cebador 5' (585):	5' -AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA <u>IIII</u> CTAAATGTTG-3'	
Secuencias víricasAACATCAGTTTTAT <u>TTGTC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	4
AACATCAGTTTTAT <u>CTGCC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
AACAT <u>TAG</u> TTTTAT <u>CTGTC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	12
AACATCAGTTTTAT <u>CTGTC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	2
AACAT <u>CA</u> TTTTAT <u>TTGTC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
AACAT <u>CA</u> TTTTAT <u>TTGTC</u> CCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
Cebador 3' (698):	5' -AACAT <u>CA</u> TTTTAT <u>ITGTC</u> CCTGC <u>AI</u> IIIIITGGCATGT-3'	
Secuencias víricasTTGACTGCTCAGCA <u>A</u> CATTGAT <u>CC</u> TGCTGTGTC.....	2
TTGAT <u>TG</u> CTCAGCA <u>A</u> CATTGAT <u>CC</u> TGCTGTGTC.....	7
TTGAT <u>TG</u> CTCAGCA <u>A</u> CATTGAT <u>CC</u> TG <u>CAG</u> CTGTGTC.....	8
TTGAT <u>TG</u> CTCAGC <u>G</u> ACATTGAT <u>CC</u> TGCTGTGTC.....	1
TTGAT <u>TG</u> CTCAGCA <u>A</u> CATTGAT <u>CC</u> TGCTGTGTC.....	1
TTGAT <u>TG</u> CTCAGCA <u>A</u> CATTAAT <u>CC</u> TGCTGTGTC.....	9
.....TTGAT <u>TG</u> CTCAGCA <u>A</u> CATTAAT <u>CC</u> CGCTGTGTC.....	2	
Cebador 3' (1007):	5' -TTGAT <u>TG</u> CTCAGC <u>I</u> ACATTGAT <u>IIII</u> IC <u>W</u> GCTGTGTC-3'	

* La diversidad genética entre aislados de MPVh se muestra como nucleótidos subrayados

Los cebadores de DS específicos del gen F del MPVh utilizados en el Ejemplo son:
 hMPV 5'-585 5'-AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAIIIICTAAATGTTG-3' (SEC ID nº 39),
 hMPV 3'-698 5'-AACATCAIIIITTTTATITGTCCTGCAIIIIIITGGCATGT-3' (SEC ID nº 40) y
 hMPV 3'-1007 5'-TTGATTGCTCAGCIACATTGATIIIIICWGCTGTGTC-3' (SEC ID nº 41),
 en los que W puede ser A o T, e I es desoxinosina.

Se extrajo el ARN total vírico mediante la utilización del metodo del ARNzol B siguiendo el protocolo del fabricante (ARN zol LS, Tel-Test, Inc.). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa para sintetizar ADNc utilizando el ARN vírico durante 1,5 horas a 42°C en un volumen de reacción de 20 µl compuesto de lo siguiente: 5 µl de ARN total (aproximadamente 100 ng), 4 µl de 5x tampón de reacción (Invitrogen, USA), 5 µl de dNTPs (cada uno 5 mM), 2

µl de hexadesoxinucleótidos aleatorios 10 µM, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa (40 unidades/µl, Promega) y 1 µl de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (200 unidades/µl, Promega).

5 La amplificación por PCR dirigida del gen F del MPVh se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl cebador de DS 5' específico de MPVh (MPVh 5'-585, 10 µM), 1 µl de cebador de DS 3' específico de MPVh (MPVh 3'-698 ó MPVh 3'-1007, 10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 10 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

15 Tal como se muestra en la fig. 10B, cada pareja de cebadores de DS específicos de MPVh (MPVh 5'-585 y MPVh 3'-698 y MPVh 5'-585 y MPVh 3'-1007) genera una única banda que corresponde a los tamaños esperados de 150 pb y 459 pb, respectivamnete (carriles 1 y 2). El posterior análisis de secuencias de los productos confirmó que son secuencias parciales del gen (F) de glucoproteína de fusión del MPVh. En contraste, dichos cebadores no generaron producto en una PCR de control negativo sin molde (carriles 4 y 5). A modo de control positivo se utilizó el conjunto de cebadores específico para la beta-actina humana (carril 3).

20 Estos resultados indican que los cebadores de DS pueden aplicarse a la detección de los MPVh de pacientes con infecciones respiratorias. De esta manera, podría hacerse efectivo que los oligonucleótidos de DS se adaptasen como cebadores en la amplificación por PCR o como sondas en un chip de oligonucleótidos, a todas las potenciales situaciones que se presentan en el campo.

25 **EJEMPLO 7: detección de una secuencia diana de nucleótidos utilizando una micromatriz de oligos de DS inmovilizados**

30 Los oligos de DS complementarios a una región de una molécula diana de ácidos nucleicos se sintetizan utilizando un sintetizador de ADN (Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI)) según un protocolo estándar. Los oligos de DS sintetizados se inmovilizan sobre un portaobjetos de vidrio como micromatriz. A continuación, se añade a la micromatriz una mezcla de reacción de extensión dependiente de molde que contiene 50 a 200 ng de muestra de ADN, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 15 mM, 5 µl de dNTP marcado fluorescentemente (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Promega), después de lo cual la micromatriz se introduce en un ciclador térmico precalentado (94°C). 35 La reacción de extensión dependiente de molde se lleva a cabo siguiendo el ciclado térmico siguiente: desnaturalización durante 5 minutos a 94°C y 15 a 50 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 a 3 minutos a 50-65°C y 1 a 4 minutos a 60-72°C, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C. Tras la reacción de extensión dependiente de molde, los oligos de DS extendidos se lavan y se detectan a partir de sus imágenes fluorescentes utilizando un escáner de micromatrices, seguido del análisis de las imágenes.

40 **EJEMPLO 8: genotipado de SNP (polimorfismos de nucleótidos individuales) utilizando oligonucleótidos de DS**

45 Los oligos de DS se sintetizan por medio de un sintetizador de ADN (Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI)) siguiendo un protocolo estándar, introduciendo una base polimórfica (sitio de interrogación) en el centro de una parte 3' de especificidad a T_m reducida. Los oligonucleótidos sintetizados se inmovilizan sobre un portaobjetos de vidrio a modo de micromatriz. A continuación, se añade a la micromatriz una mezcla de reacción de extensión dependiente de molde que contiene 50 a 200 ng de muestra de ADN, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 15 mM, 5 µl de dNTP marcado fluorescentemente (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Promega), después de lo cual la micromatriz se introduce en un ciclador térmico precalentado (94°C). La reacción de extensión dependiente de molde se lleva a cabo siguiendo el ciclado térmico siguiente: desnaturalización durante 5 minutos a 94°C y 15 a 50 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 a 3 minutos a 50-65°C y 1 a 4 minutos a 60-72°C, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C. 50 Tras la reacción de extensión dependiente de molde, los oligos de DS extendidos se lavan y se detectan a partir de sus imágenes fluorescentes utilizando un escáner de micromatrices, seguido del análisis de las imágenes. 55

<110> SEEGENE, INC.

5 <120> PROCEDIMIENTOS QUE UTILIZAN UN OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD Y OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD PARA LOS MISMOS

<130> P36413 33

10 <140> EP 06716196.8
<141> 2006-03-03

<150> KR10-2005-0018419
<151> 2005-03-05

15 <150> PCT/KR2005/001206
<151> 2005-04-26

<160> 41

20 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 35
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL19-5'-0

30 <400> 1
gtctcatctg ctgcccttaa gtctctagga gaact 35

<210> 2
<211> 36
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL19-3'-0

40 <400> 2
cataggcctg gaagaagccg cttacaata agttag 36

<210> 3
45 <211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> IL1b-5'-0

<400> 3
ggagagtgtg gatccaagc aatacccaaa gaag 34

55 <210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> IL1b-3'-0

<400> 4

agacctcagt gcaggctatg accaattcat ccc 33

<210> 5
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL19-5'

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> deoxiinosina

15 <400> 5
 gtctcatctg ctgcccttaa nnnntagga gaact 35

<210> 6
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> IL19-3'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 30 <223> deoxiinosina

<400> 6
 cataggcctg gaagaagccg nnnncaata agttag 36

35 <210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> IL1b-5'

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (21)..(25)
 <223> deoxinosina

<400> 7
 50 ggagagtgtg gatccaagc nnnnccaaa gaag 34

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> IL1b-3'

<220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> deoxiinosina

<400> 8
 agacctcagt gcaggctatg nnnnnttcat ccc 33

5 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> DEG10-5'-108

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> deoxiinosina

<400> 9
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccg atg 33

20 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> DEG10-5'-103

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 10
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctgcc atc 33

35 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> DEG10-5'-102

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 11
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccc atc 33

50 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DEG10-5'-101

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 12
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccc atg 33

5 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> DEG10-5'-158

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 13
 tgtactatg cgtatcgcc nnnnctccg atg 33

20 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> DEG10-5'-138

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 14
 35 tgtactttg cgttcgccc nnnnctccg atg 33

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DEG10-5'-128

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

50 <400> 15
 tgtagttatg ggtatcctcc nnnnctccg atg 33

<210> 16
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Pxs1-5'-10

60 <400> 16
 aaggaagaca tgctggtgat ggtgcttcta gct 33

<210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Psx2-5'-10
 <400> 17
 10 aaggaagaca tgctggtgat ggtgcttctg gcc 33
 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psx1-5'-11
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 25 <400> 18
 aaggaagaca tgctggtgat nnnnttcta gct 33
 <210> 19
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psx2-5'-11
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 40 <400> 19 aaggaagaca tgctggtgat nnnnttctg gcc 33
 <210> 20
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psxl-5'-40
 50 <400> 20
 tcttgacga tggatgggtg tggatgaatg tga 33
 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Psx2-5'-40
 60 <400> 21
 tcttgacga tggatgggtg tggatgaatc tga 33

<210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Psxl-5'-41

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> desoxiinosina

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> desoxiinosina

 25 <400> 22
 tcttgacga tggatgggtg nnnnngaang nga 33

 <210> 23
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Psx2-5'-41
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> desoxiinosina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> desoxiinosina
 50
 <400> 23
 tcttgacga tggatgggtg nnnnngaanc nga 33

 <210> 24
 55 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Psx-3'-2

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

5 <400> 24
 ttcatccaca cccatccatc nnnnnagatc cct 33

10 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> IL3-5'

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

25 <400> 25
 gctgccaggg gtcttcattc nnnnctgga tga 33

30 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> IL3-3'

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

45 <400> 26
 ggccatgagg aacattcaga nnnnnggtgc tct 33

50 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> IL15-5'

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

65 <400> 27
 atgtacgaga atctggctgc nnnnatgtg agg 33

70 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> IL15-3'

80 <220>

<221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

5 <400> 28
 atgtgatcca agtggctcat nnnnccttg ttagg 35

<210> 29
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL18-5'

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

20 <400> 29
 aggaaatgga tccacctgaa nnnntgatg atata 35

<210> 30
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> IL18-3'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 35 <223> desoxiinosina

<400> 30
 atggaaatac aggcgaggtc nnnnaaggc gca 33

40 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> IL25-5'

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 31
 agctctcaa gctggtgatc nnnncaagg cgg 33

55 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> IL25-3'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 5
 <400> 32
 gagctgcct ggatggggt nnnngtgg cct 33
 <210> 33
 10 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> IL2-5'
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 20 <223> desoxiinosina
 <400> 33
 ctctgacaac acatttgagt gcnnnnncca tgatgag 37
 25 <210> 34
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> IL2-3'
 <220> <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 35 <223> desoxiinosina
 <400> 34
 gtgctgtct aaaaatgaca gannnnngag cttattt 37
 40 <210> 35
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> IL6-5'
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 50 <223> desoxiinosina
 <400> 35
 ccaatgctct cctaacagat aannnnnagt cacagaa 37
 55 <210> 36
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> IL6-3'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> desoxiinosina
 5
 <400> 36
 aggtaaactt atacattcca agaaannnnn tggctagg 38
 <210> 37
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> IL10-5'
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 20 <223> desoxiinosina
 <400> 37
 aaggccatga atgaatttga nnnnntcatc aactg 35
 25 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> IL10-3'
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 38
 tgacagtagg ggaaccctct nnnnngctgc agg 33
 40 <210> 39
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> MPVh 5'-585
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (23)..(27)
 <223> desoxiinosina
 <400> 39
 55 agcttcagtc aattcaacag aannnnncta aatgttg 37
 <210> 40
 <211> 37
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MPVh 3'-698

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)
 5 <223> desoxiinosina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)
 10 <223> desoxiinosina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(29)
 15 <223> desoxiinosina

<400> 40
 aacatcantt ttatntgtcc tgcannnnnt ggcattg 37

20 <210> 41
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> MPVh 3'-1007

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)
 <223> desoxiinosina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)
 <223> desoxiinosina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> desoxiinosina

<400> 41
 45 ttgantgctc agcnacattg atnnnnncwg ctgtgctc 37

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende amplificar la secuencia diana de ácidos nucleicos llevando a cabo por lo menos dos ciclos de hibridación de cebadores, extensión de cebadores y desnaturalización, utilizando un conjunto de cebadores que comprende una pareja de oligonucleótidos de doble especificidad con especificidad de hibridación incrementada, en el que cada oligonucleótido de doble especificidad se encuentra representado por la fórmula general siguiente:



en la que X_p representa una parte 5' de especificidad a T_m elevada que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de un ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo; Y_q representa una parte de separación que comprende por lo menos tres bases universales contiguas; Z_r representa una parte 3' de especificidad a T_m reducida que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo; p, q y r representan el número de nucleótidos y p representa un número entero igual o superior a 15; q representa un número entero igual o superior a 3 y r representa un número entero igual o superior a 3; y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a T_m reducida, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte 5' de especificidad a T_m elevada es más larga que la parte 3' de especificidad a T_m reducida; la parte de separación forma un tramo en el que no se aparean las bases, que no sirve como sitio de hibridación y que no interactúa con el molde para el apareamiento de bases, bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida se hibridan con el ácido nucleico molde, permitiendo que la parte 5' de especificidad a T_m elevada se diferencie de la parte 3' de especificidad a T_m reducida en términos de especificidad de hibridación con el ácido nucleico molde, en donde la especificidad de hibridación del oligonucleótido se determina dualmente a partir de la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a T_m reducida de manera que la especificidad de hibridación global del oligonucleótido resulta incrementada; en donde la hibridación de la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce la hibridación únicamente con la parte 3' de especificidad a T_m reducida, en el que un primer y segundo ciclos de la reacción de amplificación implican la hibridación de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a T_m reducida de la parte dual y de la parte 3' de especificidad a T_m reducida del oligonucleótido de doble especificidad con la secuencia diana de ácidos nucleicos, y los ciclos posteriores de la reacción de amplificación implican la hibridación de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a T_m reducida del oligonucleótido de doble especificidad con una secuencia derivada del oligonucleótido de doble especificidad incorporado en el producto amplificado, en el que la base universal contenida en la parte de separación es desoxiinosina o inosina.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la hibridación se lleva a cabo a una temperatura de entre 45°C y 68°C.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la parte 3' de especificidad a T_m reducida presenta la secuencia de nucleótidos hibridante perfectamente complementaria al sitio del ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo.
5. Método según la reivindicación 1, en el que p representa un número entero entre 15 y 40.
6. Método según la reivindicación 5, en el que p representa un número entero entre 15 y 25.
7. Método según la reivindicación 1, en el que q representa un número entero entre 3 y 10.
8. Método según la reivindicación 1, en el que r representa un número entero entre 3 y 15.
9. Método según la reivindicación 1, en el que p es un número entero entre 15 y 25, q es un número entero entre 3 y 10, y r es un número entero entre 3 y 15.
10. Método según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es de entre 40°C y 80°C.
11. Método según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte 3' de especificidad a T_m reducida es de entre 10°C y 40°C.
12. Método según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte de separación es de entre 3°C y 15°C.
13. Método según la reivindicación 1, en el que la secuencia diana de ácidos nucleicos comprende dos o más secuencias diana de ácidos nucleicos y el conjunto de cebadores comprende dos o más conjuntos de cebadores para la amplificación multiplex.

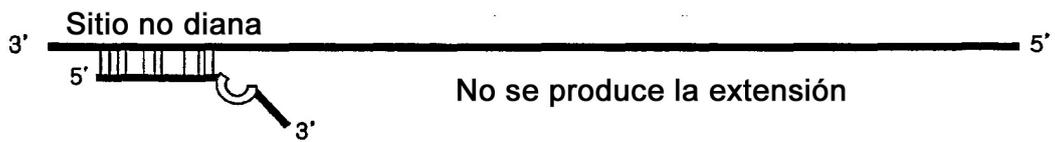
FIG. 1A

Especificidad de hibridación elevada del oligonucleótido de doble especificidad

(a) Sin extensión

No se produce la extensión

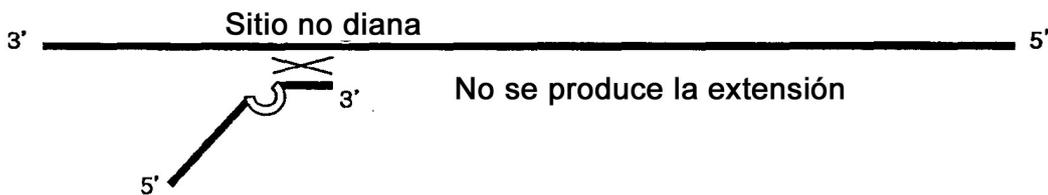
en el caso de que la parte de extremo 5', pero no la parte de extremo 3', se encuentre hibridada con el molde



(b) Sin hibridación

No se produce la hibridación

en el caso de que la parte de extremo 3', pero no la parte de extremo 5', presente una secuencia complementaria al sitio no diana



(c) Extensión

Tanto la parte de extremo 5' como la del extremo 3' se hibridan con la secuencia diana y por lo tanto se produce con éxito la extensión

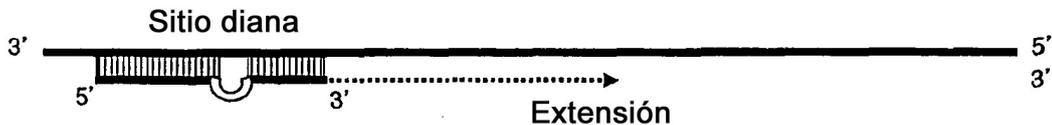
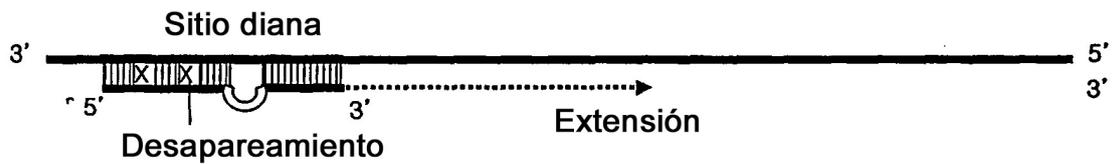


FIG. 1B

Tolerancia al desapareamiento del oligonucleótido de doble especificidad

(a) Extensión

Se tolera el desapareamiento en la parte de extremo 5' ya que tanto la parte de extremo 5' como la de extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde



(b) Extensión

Se tolera el desapareamiento en la parte de extremo 3' ya que tanto la parte de extremo 5' como la de extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde



(c) Extensión

Se toleran los desapareamientos en las partes de extremos 5' y 3' ya que tanto la parte de 5' como la del extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde

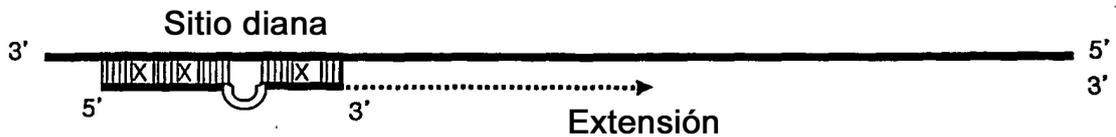


FIG. 2

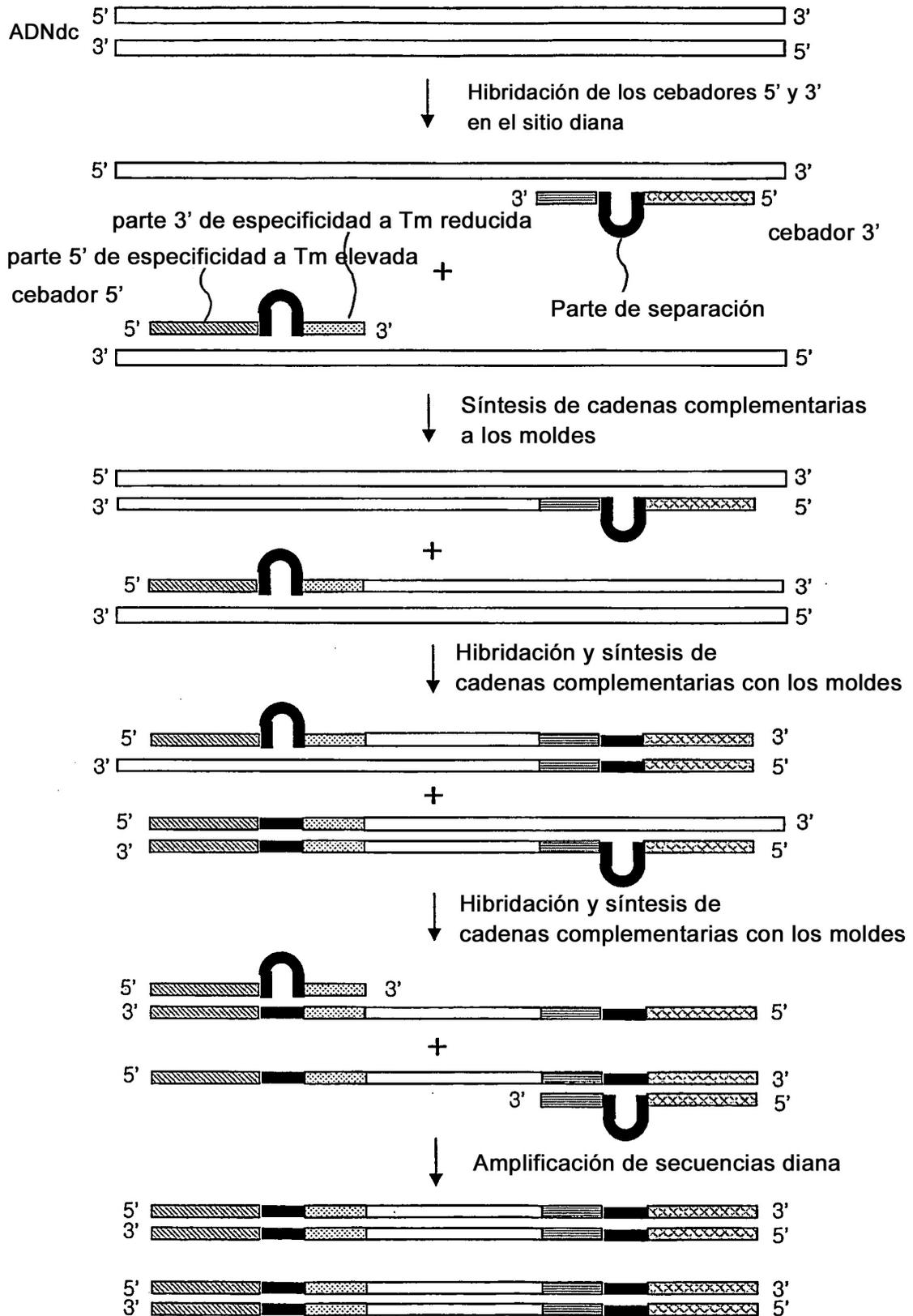


FIG. 3

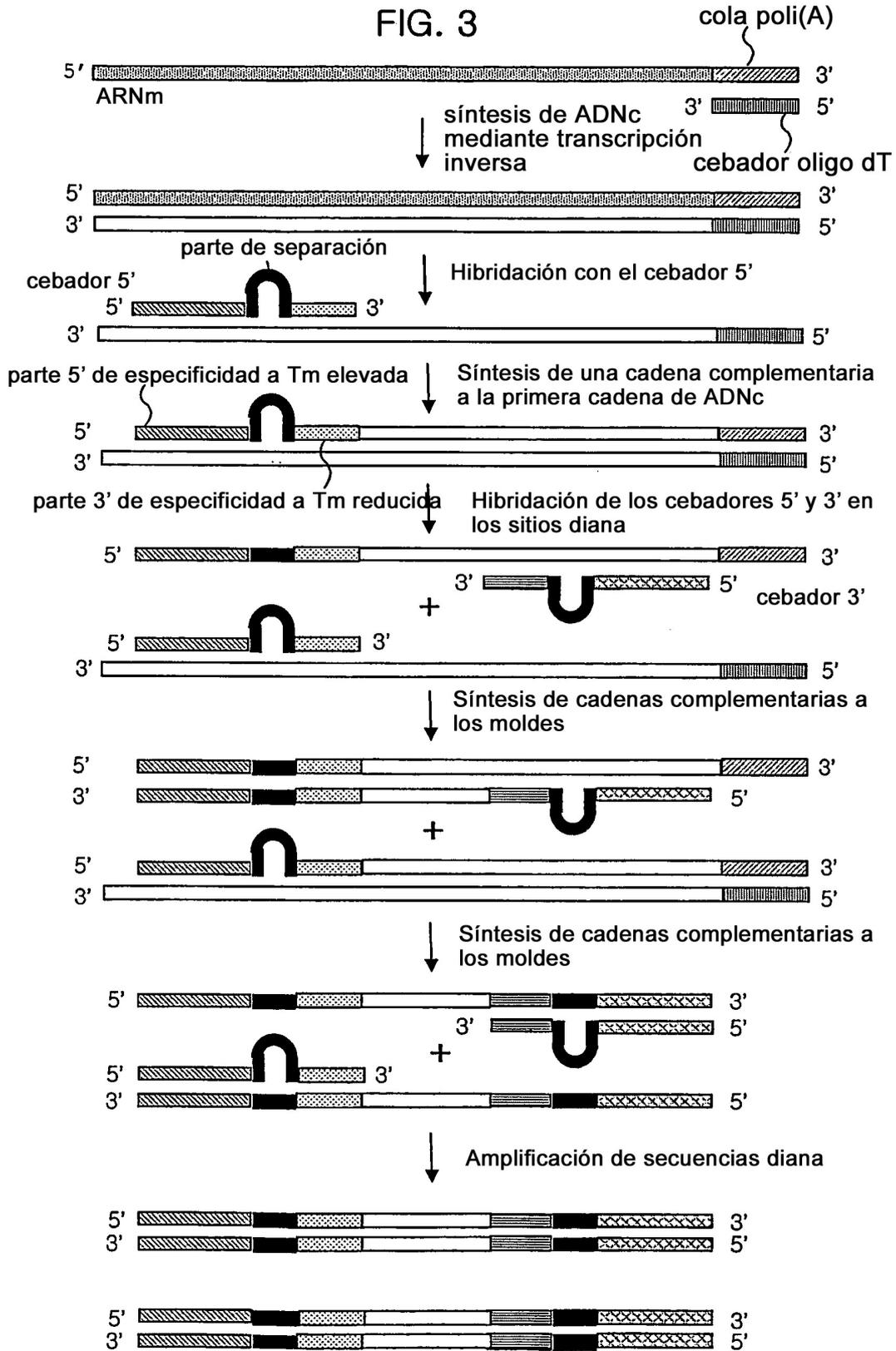
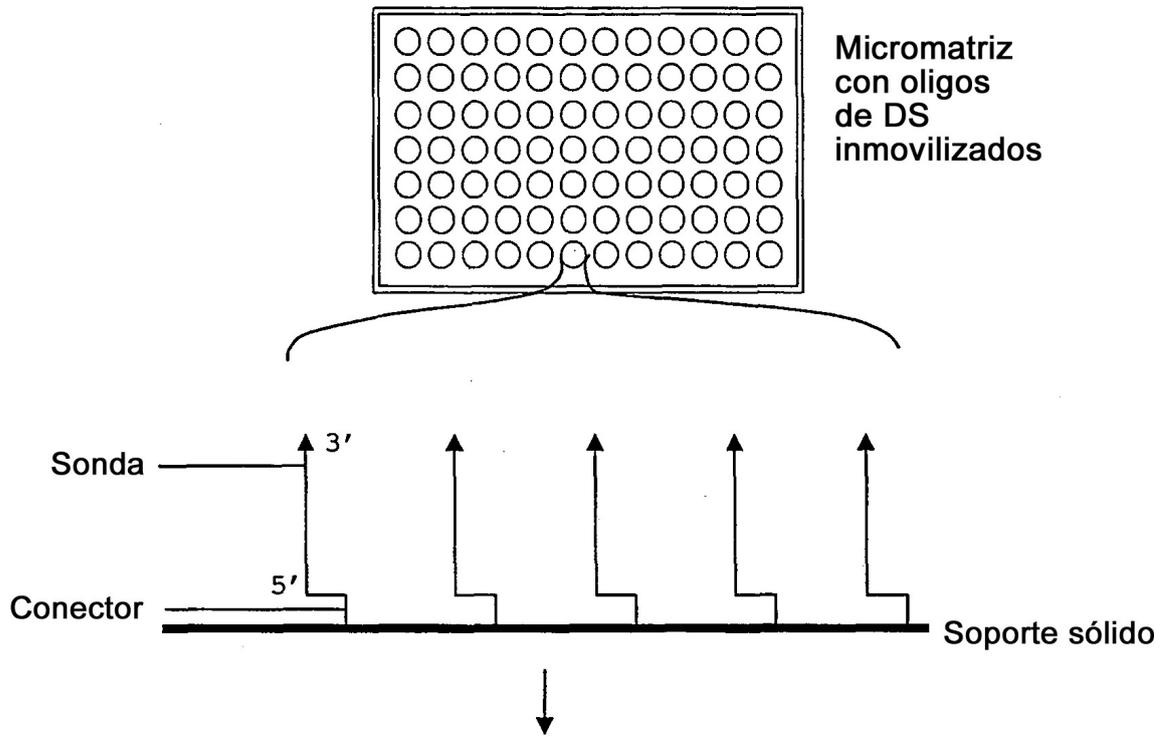


FIG. 4



1º ciclo: los ácidos nucleicos molde se hibridan con las sondas oligonucleótidas diana, seguido de la extensión complementaria

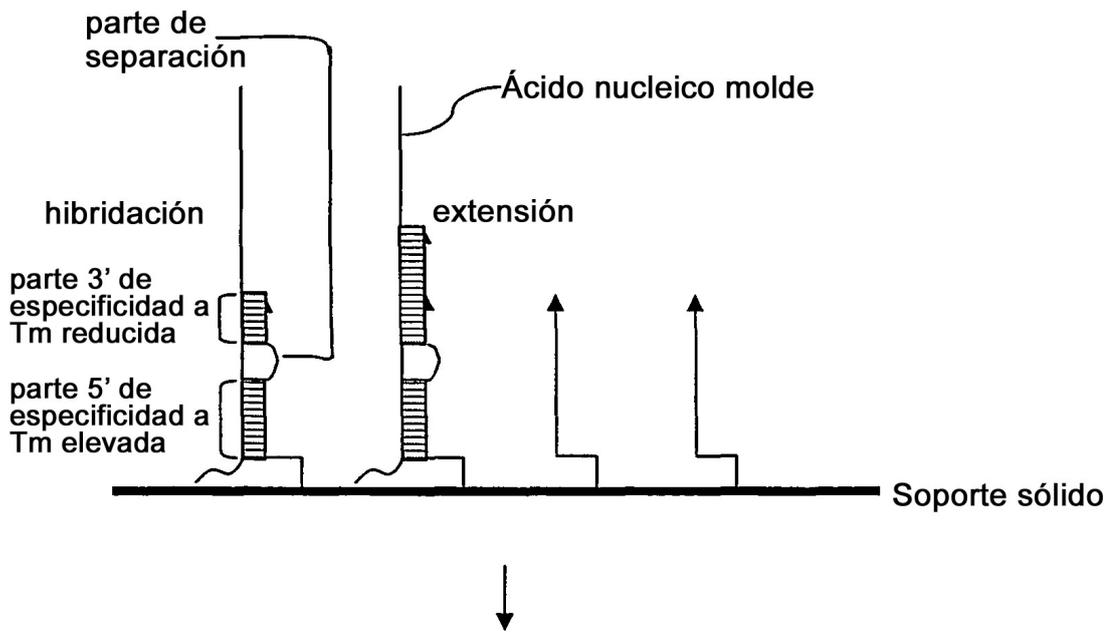
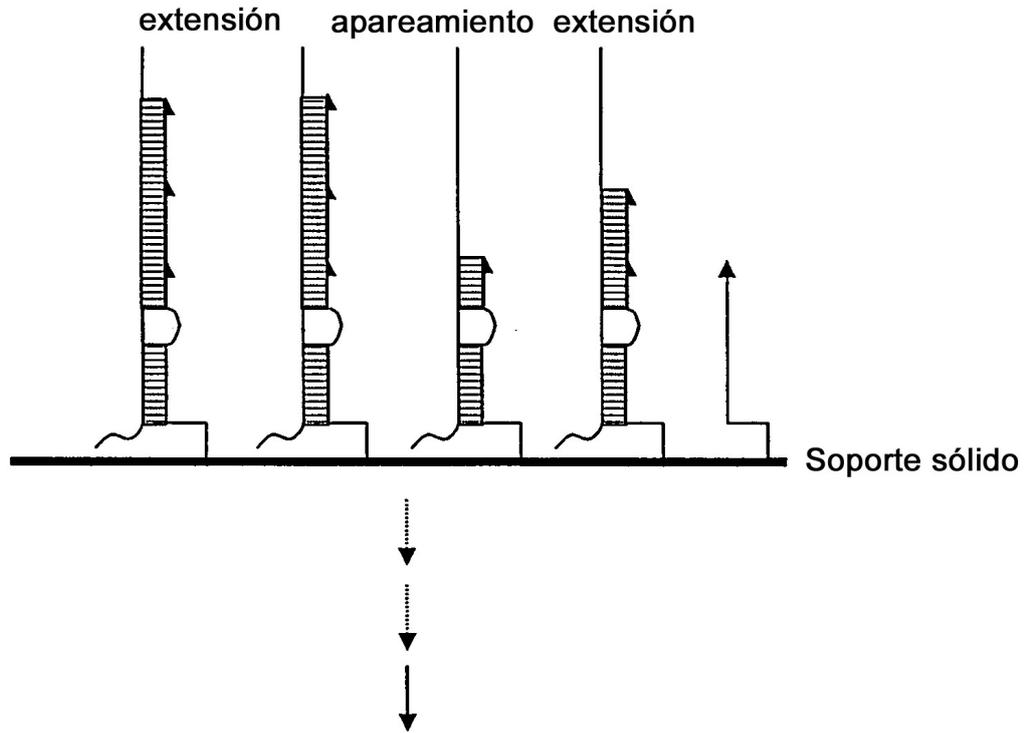


FIG. 4 (continuación)

2º ciclo: las sondas oligonucleótidas diana no hibridadas se hibridan con ácidos nucleicos molde, seguido de la extensión complementaria.



Se repite el ciclo hasta que la totalidad o la mayoría de las sondas oligonucleótidas diana se hayan hibridado con los ácidos nucleicos molde.

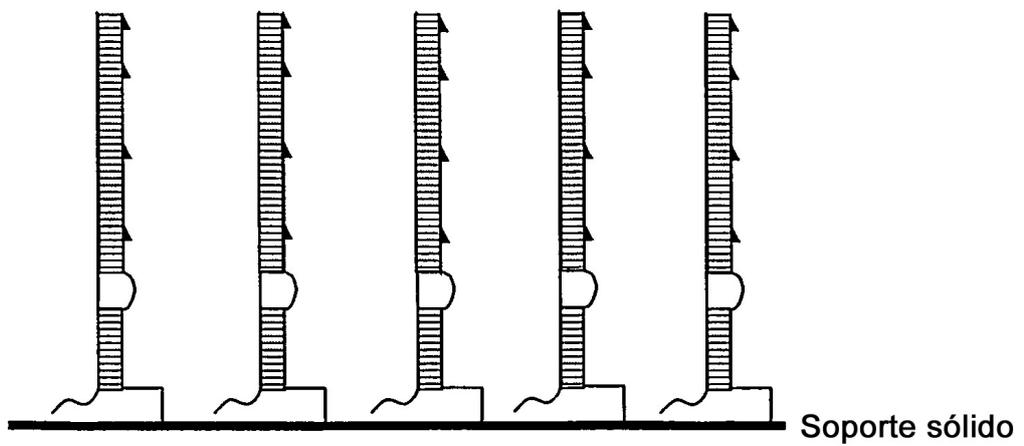


FIG. 5

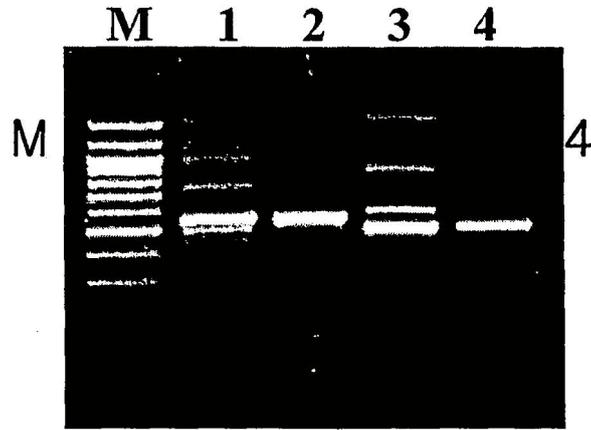


FIG. 6A

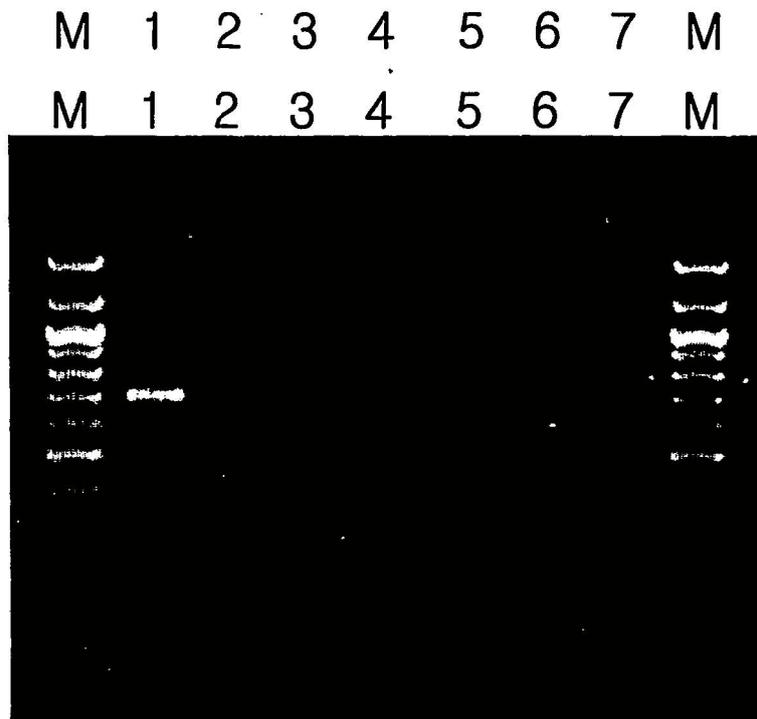


FIG. 6B

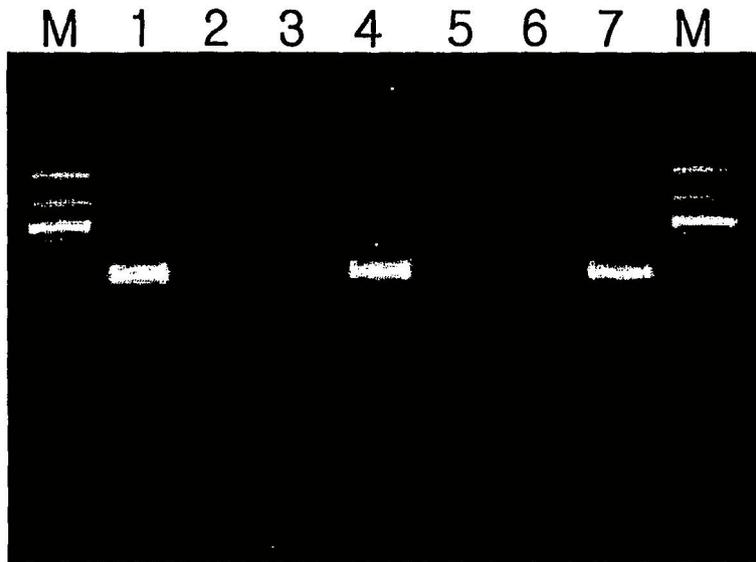


FIG. 7A

Psx1 580 GTAAGGAGGGATCTTGCACGATGGATGGGTG**TGGATGAATCT**GATGTGCAGAAATTGGT.....

Psx2 580 GTAAGGAGGGATCTTGCACGATGGATGGGTG**TGGATGAATCT**GATGTGCAGGAGTGGT.....

Psx1-5'-40:5' -TCTTGCACGATGGATGGGTG**TGGATGAATCT**GA-3'

Psx2-5'-40:5' -TCTTGCACGATGGATGGGTG**TGGATGAATCT**GA-3'

Psx1-5'-41:5' -TCTTGCACGATGGATGGGTG**IIII**IGAA**IG**IGA-3'

Psx2-5'-41:5' -TCTTGCACGATGGATGGGTG**IIII**IGAA**IC**IGA-3'

cebadores

5'

FIG. 7B

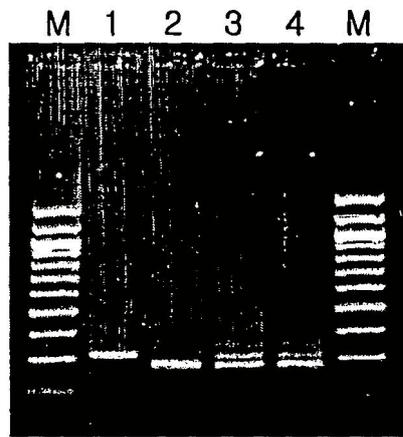


FIG. 8

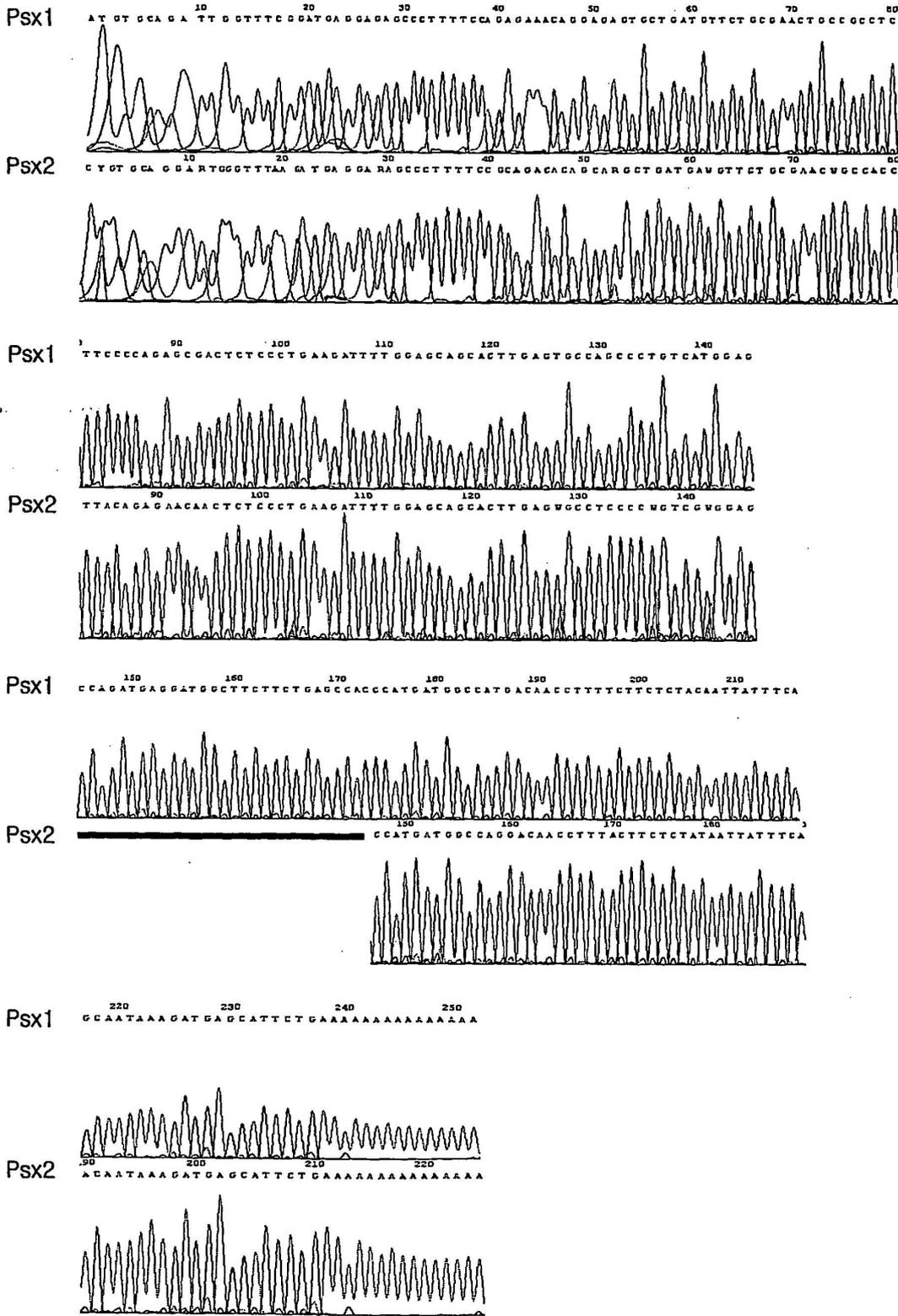


FIG. 9

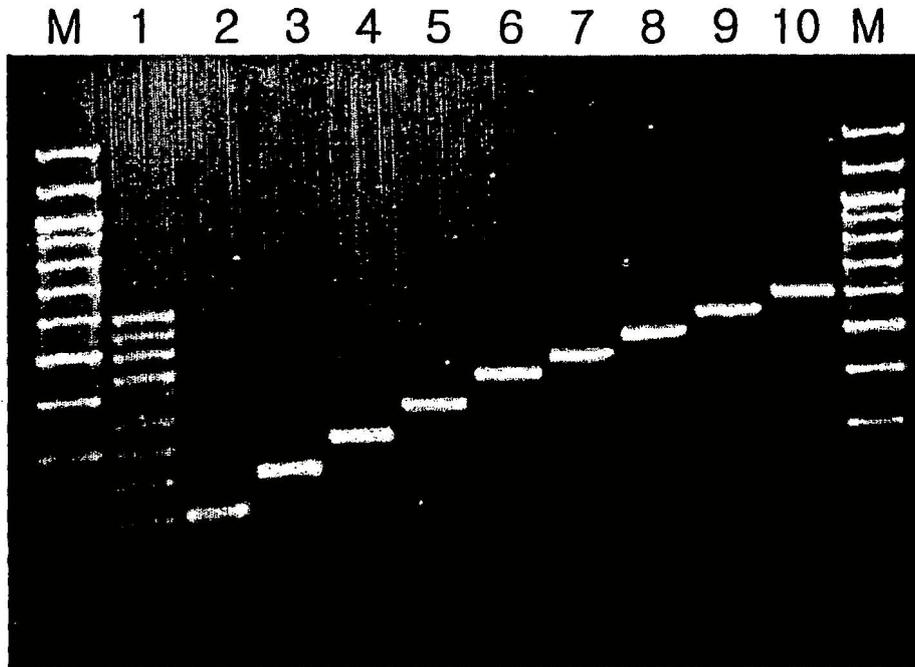


FIG. 10

