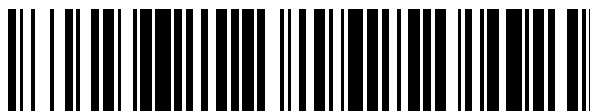


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 224**

51 Int. Cl.:  
**C07H 21/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09772756 .4**  
96 Fecha de presentación: **03.07.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2307436**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2011**

54 Título: **Nueva sonda de detección**

30 Prioridad:  
**04.07.2008 FR 0854549**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.04.2012**

73 Titular/es:  
**Biomérieux**  
**Chemin de l'Orme**  
**69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:  
**Laayoun, Ali y**  
**Bernal Mendez, Eloy**

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

ES 2 378 224 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nueva sonda de detección.

La presente invención se refiere a la detección de ácidos nucleicos mediante nuevas sondas nucleotídicas. La invención es aplicable en el campo del diagnóstico.

5 Hoy en día, la búsqueda de secuencias nucleotídicas diana representa un objetivo fundamental en numerosos laboratorios y principalmente en el campo médico o agroalimentario. En estos campos, la búsqueda de secuencias diana tiene como objetivo, por ejemplo, la detección de organismos patógenos, la búsqueda de una contaminación bacteriana en una cadena agroalimentaria o también el diagnóstico de mutaciones en el origen de enfermedades genéticas o de cánceres. Las principales dificultades de estos métodos residen en la especificidad, la sensibilidad, la rapidez y la reproducibilidad del ensayo utilizado. Es indispensable poder dar un resultado cierto y esto esencialmente en el campo del diagnóstico.

10 En la bibliografía se describen diferentes tipos de métodos. Estos se basan generalmente en las propiedades de apareamiento de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos, denominada habitualmente "hibridación de ácidos nucleicos" o simplemente "hibridación". Véase D. ZHANG et al., *Clinica chimica acta* 363 (2006) págs. 61-70, o J. Yi, *Nucleic acid research* (2006) Vol 34 (11), l81. De manera general, después de determinar la secuencia específica de un organismo o de una enfermedad que debe analizarse, es conveniente extraer los ácidos nucleicos de una muestra, y eventualmente amplificar y detectar la secuencia de interés. De este modo, se han desarrollado numerosos métodos de amplificación tales como PCR, LCR, NASBA, TMA, SDA. Del mismo modo, existe un gran número de técnicas de detección. Una de ellas emplea sondas particulares, descritas por Tyagi & Kramer (*Nature Biotech*, 1996, 14: 303-308), conocidas habitualmente con el nombre de "*molecular beacons*" (balizas moleculares). Estas sondas tienen una estructura en horquilla para el pelo que comprende una parte de "bucle" de cadena sencilla y una parte de "tallo" de cadena doble. La parte de "bucle" contiene una secuencia complementaria de la secuencia nucleotídica diana y la parte de "tallo" está formada por dos secuencias complementarias una de la otra. El extremo libre de una de las secuencias complementarias de la parte de "tallo" está marcado con un fluoróforo mientras que el otro extremo libre de la otra cadena de la parte de "tallo" está acoplado a un extintor de fluorescencia o "*quencher*". En ausencia de una secuencia diana complementaria, la sonda de detección está en forma de horquilla para el pelo y la sonda no produce fluorescencia, siendo la energía del fluoróforo transferida directamente al extintor de fluorescencia. Cuando esta sonda hibrida con una secuencia diana, pierde su configuración, los extremos 5' y 3' se alejan y el extintor de fluorescencia y el fluoróforo se separan uno del otro. La fluorescencia emitida refleja entonces la hibridación de la sonda en la diana que es detectada durante su amplificación y eventualmente cuantificada. Se habla entonces de la detección en fase homogénea en tiempo real (o detección en "*real-time*"). Sin embargo, estas sondas *molecular beacon* pueden presentar una apertura prematura no deseada de la parte de "tallo" en presencia de ciertos contaminantes. En efecto, se ha observado que las sondas *molecular beacons* interactúan, mediante mecanismos desconocidos, con las enzimas presentes en el medio de reacción tal como el utilizado en una amplificación de tipo NASBA, por ejemplo. Estas interacciones se producen en ausencia, incluso, de cualquier diana biológica y están en el origen de un aumento de señal de fluorescencia no específica.

15 Las sondas *molecular beacons* presentan importantes limitaciones de síntesis, requieren un diseño muy particular a nivel de las secuencias del tallo. En efecto, pueden hibridar de forma no específica con la diana a detectar, particularmente cuando ésta es rica en bases GC, induciendo falsos positivos o ruidos de fondo importantes que afectan a la sensibilidad de detección. Además, es necesario introducir dos secuencias complementarias para formar el tallo, la secuencia completa de la sonda en horquilla para el pelo comprende entonces al menos 30 nucleótidos, mientras que solamente 20 nucleótidos son generalmente necesarios para el reconocimiento molecular. Debido a esto, el rendimiento de síntesis de estas sondas en horquilla para el pelo es bastante limitado. Otro inconveniente de estas sondas es la dificultad de diseño de la estructura en horquilla para el pelo debido a la estructura "tallo-bucle" que facilita el repliegue del bucle sobre sí mismo y las interacciones internas "bucle-bucle". De este modo, varios diseños y síntesis son entonces a menudo necesarios antes de encontrar la secuencia que posee las características termodinámicas buscadas.

20 Se han propuesto diferentes soluciones para intentar paliar el problema de hibridación no específica del tallo. De este modo, Crey-Desbiolles et al. (*Nucleic Acids Res.*, mayo de 2005; 33: e77) propusieron la sustitución de los nucleótidos naturales del tallo por nucleótidos modificados que hibridan entre sí para formar el tallo pero que no pueden hibridar con los nucleótidos naturales de la diana. El inconveniente de esta estrategia es, principalmente, la necesidad de introducir, en cada extremo de la secuencia de reconocimiento, al menos de cuatro a cinco unidades de este nucleótido modificado, mientras que no está disponible en el mercado, lo que complica la síntesis de la sonda en horquilla para el pelo. Por otro lado, esta estrategia no resuelve el problema del elevado número de nucleótidos de la secuencia completa ni el de la dificultad de diseño de la estructura de la horquilla para el pelo.

25 Otra solución propuesta por Browne (*J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 1989-1994) consiste en introducir nucleótidos invertidos en las dos secuencias del tallo. En esta realización, las secuencias del tallo no pueden hibridar directamente con las secuencias de la diana contiguas a la secuencia hibridada con el bucle, debido a su orientación paralela con la diana. El inconveniente de esta técnica es que las secuencias del tallo pueden interactuar con otras secuencias de la diana más lejanas que podrían replegarse y hacerse accesibles para esta interacción. Además, los

problemas del elevado número de nucleótidos de la secuencia completa y el de la inestabilidad de la estructura en horquilla para el pelo no se resuelven mediante esta estrategia.

Otra solución propuesta por Tsourkas et al. (Nucleic Acids Res., octubre de 2002; 30: 4208 - 4215) consiste en diseñar la sonda en horquilla para el pelo de tal manera que una de las secuencias que forman el tallo forme también parte de la secuencia de reconocimiento. Esta solución permite acortar la secuencia completa de la sonda. Sin embargo, se ha observado una pérdida de especificidad, asociada a este diseño. Además, para la misma secuencia de reconocimiento, este tipo de diseño posee un bucle más corto, lo que limita su flexibilidad y refuerza las interacciones bucle-bucle, lo que hace a las características termodinámicas de la sonda menos previsibles.

Existe, por lo tanto, una necesidad real de un nuevo formato de sonda que permita paliar los inconvenientes de la técnica anterior.

A este respecto, la invención se refiere a una nueva sonda de detección de un ácido nucleico diana, constituida por una cadena nucleotídica marcada que comprende tres fragmentos:

- un primer fragmento que presenta una primera secuencia de cierre,
- un segundo fragmento del que todo o parte presenta una secuencia de reconocimiento para el reconocimiento molecular del ácido nucleico diana,
- un tercer fragmento que presenta una segunda secuencia de cierre, y
- al menos dos marcadores, estando uno de los extremos de la cadena de dicha sonda de detección libre de cualquier marcador,

en la que, cuando las dos secuencias de cierre hibridan conjuntamente, la sonda de detección tiene una forma completamente circular, manteniendo dichas secuencias de cierre de este modo a dicha sonda en una conformación no detectable en ausencia de dicho ácido nucleico diana. Se entiende por completamente circular, una conformación de la sonda cuando las dos secuencias de cierre hibridan una con la otra para formar una doble hélice, estando uno de los extremos de una de las secuencias de cierre unido al extremo opuesto de la otra secuencia de cierre por medio de la secuencia de reconocimiento, formando el conjunto un círculo de acuerdo con las figuras 1 y 2. Al contrario que una estructura en horquilla para el pelo, esta conformación permite mantener a la secuencia bucle en disposición lineal, estirada entre los dos extremos del tallo, lo que impide las interacciones internas en la secuencia del bucle, y facilita también su accesibilidad por la diana complementaria.

En una realización interesante de la invención, la sonda de detección se caracteriza porque un primer marcador es portado por un nucleótido del primer fragmento y un segundo marcador es portado por un nucleótido del segundo o del tercer fragmento, siendo los dos nucleótidos contiguos cuando las dos secuencias de cierre hibridan.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la sonda de detección se caracteriza porque todo o parte de las dos secuencias de cierre hibridan de forma paralela. De forma ventajosa, una de las secuencias de cierre es una secuencia constituida por nucleótidos de anomería *alfa*.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la sonda de detección se caracteriza porque todo o parte de las dos secuencias de cierre hibridan de forma anti-paralela. De forma ventajosa, una de las dos secuencias de cierre está unida a la secuencia de reconocimiento mediante un enlace invertido 5'-5' o 3'-3'.

De forma ventajosa, al menos un marcador es un fluoróforo y al menos otro marcador es un extintor de fluorescencia. De este modo, cuando las dos secuencias de cierre hibridan conjuntamente, los nucleótidos que portan los marcadores están contiguos de tal manera que toda o gran parte de la energía del fluoróforo después de la excitación es transferida al extintor de fluorescencia. Preferentemente, los dos marcadores son portados por nucleótidos cuya posición está uno frente al otro, estando estos dos nucleótidos unidos entre sí mediante puentes de hidrógeno, formando un emparejamiento de bases, o distantes de 1 a 5 nucleótidos.

De forma ventajosa, toda o parte de la primera o de la segunda secuencia de cierre puede hibridar con la secuencia diana. Esta conformación permite un mejor control de la distancia entre el fluoróforo y el extintor de fluorescencia, ya que al estar una de las secuencias de cierre inmovilizada sobre la diana, las dos secuencias de cierre no pueden acercarse entre sí tanto como si estuvieran las dos en conformación flexible de cadena sencilla. Esta conformación también tiene la ventaja de reducir el número de nucleótidos libres que pueden interactuar de forma no específica y la de reducir el número de nucleótidos de la secuencia completa. De forma ventajosa, la longitud de la sonda está comprendida entre 25 y 40 nucleótidos.

De acuerdo con la realización anterior, la sonda una vez hibridada con la secuencia diana, tiene una secuencia de cierre que participa en la hibridación mientras que la otra secuencia de cierre es incapaz de hibridar, debido a su orientación inversa o a la presencia de nucleótidos *alfa*. Esta conformación permite limitar las hibridaciones no específicas. Además, durante el diseño de la sonda, la adición de la secuencia de cierre modificada (*alfa* o inversa) al resto de la sonda, no influye en el diseño de la secuencia de reconocimiento. De este modo, el diseño se limita a

5 definir la secuencia complementaria correcta de la diana en función de las condiciones de detección, y añadir a continuación en uno de sus extremos una secuencia de cierre modificada (*alfa* o inversa) complementaria de la otra secuencia de cierre capaz de hibridar con la diana, sin tener que verificar las posibles interacciones con la diana ni tener que añadir una secuencia en cada extremo, como es el caso para las sondas en horquilla para el pelo. El diseño de la sonda se facilita, por lo tanto.

De forma más ventajosa, la longitud de las secuencias de cierre está comprendida entre 6 y 30 nucleótidos, preferentemente entre 6 y 15 nucleótidos.

10 En una realización particular, una secuencia nucleotídica se une a la sonda de detección. Preferentemente, se une en el extremo de la secuencia de cierre natural es decir a la secuencia que no está ni invertida ni constituida por nucleótidos *alfa*. De este modo, la sonda de detección de acuerdo con la presente invención puede adaptarse al diseño de la sonda llamada "*tentacle probe*" (sonda tentáculo) de acuerdo con la solicitud de patente WO-A-07/114986.

15 La sonda de detección de acuerdo con la presente invención puede emplearse en cualquier ensayo en el que se utilice una sonda nucleotídica para detectar un ácido nucleico diana. De este modo, otro objeto de la presente invención se refiere a un método para detectar una secuencia diana que puede estar presente en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto a la muestra con una sonda de detección de acuerdo con la presente invención,
- detectar la formación de un híbrido entre la sonda de detección y la secuencia diana, que indica la presencia de dicha secuencia diana en dicha muestra.

20 En una realización preferida de la invención, la detección se realiza conjuntamente con una reacción de amplificación de la secuencia diana, se habla entonces de detección en tiempo real. En otra realización preferida, la detección se realiza después de una reacción de amplificación de la secuencia diana, se habla entonces de detección "*end-point*" (en punto final). La reacción de amplificación puede basarse en cualquier método de amplificación, lineal o exponencial, tal como PCR, LCR, NASBA, TMA, SDA, RCA. Preferentemente el método de amplificación es un método de amplificación que produce ácidos nucleicos de cadena sencilla ADN o ARN, tal como NASBA, TMA o PCR asimétrica.

30 Otro objeto de la invención se refiere a un kit para detectar una secuencia diana que comprende al menos una sonda de detección de acuerdo con la presente invención. Este kit puede contener eventualmente los reactivos y secuencias de cebadores necesarios para la realización de una reacción de amplificación. Por ejemplo, un kit de acuerdo con la presente invención, adaptado a una amplificación NASBA, puede contener nucleótidos y enzimas de amplificación tales como transcriptasas inversas, RNasa H y T7 ARN polimerasa.

Las siguientes definiciones permitirán entender mejor la invención.

35 La expresión "ácido nucleico" o "secuencia nucleotídica" significa una sucesión de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprende eventualmente al menos un nucleótido modificado, por ejemplo al menos un nucleótido que comprende una base nucleica modificada, tal como inosina, metil-5-desoxicitidina, dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada que permita la hibridación. Este polinucleótido también puede modificarse a nivel del enlace internucleotídico como por ejemplo los fosforotioatos, H-fosfonatos, alquil-fosfonatos, a nivel del esqueleto como los *alfa*-oligonucleótidos (FR 2 607 507) o PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992) o 2' O-  
40 alquil ribosa y LNA (BW, Sun et al., Biochemistry, 4160-4169, 43, 2004). El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ARN ribosómico, un ARN mensajero, un ARN de transferencia, o un ácido nucleico obtenido mediante una técnica de amplificación enzimática, tal como:

- 45 • PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [reacción en cadena de la polimerasa], descrita en las patentes US-A-4.683.195, US-A-4.683.202 y US-A-4.800.159, y su derivada RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*) [PCR de transcripción inversa], particularmente en un formato de una etapa, tal como se describe en la patente EP-B-0.569.272,
- LCR (*Ligase Chain Reaction*) [reacción en cadena de la ligasa], expuesta por ejemplo en la solicitud de patente EP-A-0.201.184,
- 50 • RCR (*Repair Chain Reaction*) [reacción de reparación en cadena], descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069,
- 3SR (*Self Sustained Sequence Replication*) [replicación de secuencia auto-sostenida] con la solicitud de patente WO-A-90/06995,

- NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) [amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico] con la solicitud de patente WO-A-91/02818,
  - TMA (*Transcription Mediated Amplification*) [amplificación mediada por transcripción] con la patente US-A-5.399.491, y
- 5
- RCA (*Rolling Circle Amplification*) [amplificación por círculo rodante] descrita en la patente US-6.576.448.

En el sentido de la presente invención, se entiende por “diana” o “ácido nucleico diana”, una secuencia nucleotídica de la que al menos una parte de la sucesión de restos nucleotídicos es específica y complementaria de la secuencia nucleotídica de la sonda de detección utilizada. La diana puede ser natural u obtenida de una reacción de amplificación enzimática *in vitro*, como NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia. Cuando la secuencia diana se obtiene de una reacción de amplificación enzimática *in vitro*, las secuencias producidas por esta amplificación se denominan “amplicones”.

Por “sonda de detección”, se entiende una secuencia nucleica de 10 a 100 restos nucleotídicos, particularmente de 10 a 50 restos nucleotídicos y preferentemente de 25 a 40 nucleótidos. Esta sonda comprende un fragmento nucleotídico llamado segundo fragmento del que al menos una parte de la sucesión de restos nucleotídicos es específica y complementaria de la secuencia nucleotídica de la diana. Esta sonda comprende también otros dos fragmentos llamados primer y tercer fragmentos que presentan, cada uno, una secuencia de cierre cuya longitud está comprendida entre 6 y 30 nucleótidos y preferentemente entre 6 y 15 nucleótidos.

Por “primer fragmento”, se entiende una secuencia nucleotídica que puede ser complementaria y de polaridad adaptada a dicho tercer segmento durante la presencia de este último.

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

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

Por “marcador”, se entiende una molécula portada por un nucleótido. El enlace entre el marcador y el nucleótido puede realizarse de diferentes formas conocidas por el experto en la materia. El acoplamiento manual se realiza mediante la utilización de marcadores que portan un grupo activado, típicamente un carboxilo o un tiol, que están acoplados a un nucleótido interno modificado que porta el grupo reactivo correspondiente (amina o tiol, por ejemplo), o en un extremo de la cadena nucleotídica modificada con estos mismos grupos reactivos. El acoplamiento automático se realiza mediante la utilización de fosforamiditas que portan el marcador, y entonces el acoplamiento se realiza durante la síntesis automatizada de la cadena nucleotídica, en un extremo de la cadena, o en una posición interna, en función del tipo de fosforamidita utilizado.

Por “fluoróforo”, se entiende una molécula que emite una señal de fluorescencia cuando es excitada por luz a una longitud de onda conveniente. El fluoróforo puede ser particularmente una rodamina o un derivado tal como Rojo Texas, una fluoresceína o un derivado, un fluoróforo de la familia de Alexa tales como Alexa532 y Alexa647, Alexa 405, Alexa 700, Alexa 680, o cualquier otro fluoróforo conveniente en función del aparato de medición utilizado. Los fluoróforos disponibles para las sondas de detección son muy variados y conocidos por el experto en la materia.

En el sentido de la presente invención, se entiende por “fluoresceína” una molécula química aromática que emite una señal de fluorescencia con un máximo de emisión en torno a 530 nm, cuando es excitada por luz a una longitud de onda en torno a 495 nm.

Por “extintor de fluorescencia” o “quencher” o “extintor”, se entiende una molécula que interfiere en la fluorescencia emitida por un fluoróforo. Este extintor puede seleccionarse entre moléculas aromáticas no fluorescentes, para evitar emisiones parásitas. Preferentemente, dicho extintor es un Dabsilo o un Dabcilo o un “Black hole quencher™” que son moléculas aromáticas no fluorescentes que impiden la emisión de fluorescencia cuando se encuentran físicamente en las proximidades de un fluoróforo. La técnica de transferencia de energía de fluorescencia mediante resonancia (FRET) también puede utilizarse tal como se ha descrito por ejemplo en *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*, p. 4, Ed. V.V. Didenko, Humana Press 2006, ISSN 1064-3745. El extintor también puede seleccionarse entre moléculas fluorescentes tales como por ejemplo TAMRA (carboxitetrametilrodamina).

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

- antiparalela: en este caso el oligonucleótido hibrida en el sentido invertido de la secuencia complementaria. En la presente invención, una de las realizaciones presenta una de las secuencias de cierre que está constituida entonces por nucleótidos invertidos para que la sonda de detección tenga una forma circular cuando dicha secuencia de cierre está hibridada con la otra secuencia de cierre.

□ paralela: en este caso, el oligonucleótido hibrida en el mismo sentido que la secuencia complementaria. En la presente invención, una de las realizaciones presenta una de las secuencias de cierre que está constituida entonces por nucleótidos *alfa* para que la sonda de detección tenga una forma circular cuando dicha secuencia de cierre está hibridada con la otra secuencia de cierre.

5 Por “hibridación”, se entiende el proceso durante el cual, en las condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos de cadena sencilla, que tienen en todo o en parte secuencias suficientemente complementarias, son susceptibles de formar una cadena doble o “doble hélice” estabilizada mediante puentes de hidrógeno entre las bases nucleicas. Las condiciones de hibridación son determinadas por la rigurosidad, es decir el rigor y la reducida salinidad de las condiciones operatorias. La hibridación es tanto más específica en cuanto se realiza a mayor rigurosidad. La rigurosidad se define particularmente en función de la composición en bases de una doble hélice sonda/diana, así como mediante el grado de emparejamiento erróneo entre dos ácidos nucleicos. La rigurosidad también puede estar en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturizantes y/o la temperatura de hibridación. La rigurosidad de las condiciones en las cuales una reacción de hibridación debe realizarse dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia.

20 Por “nucleótidos *alfa*” o “nucleótido de anomería *alfa*”, se entiende desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos con configuración anomérica no natural *alfa*, en el que la base nitrogenada portada por el carbono anomérico de la desoxirribosa está situado por debajo del plano en lugar de estar por encima del plano, como en el caso de los nucleótidos *beta*. La base nitrogenada de los nucleótidos *alfa* puede ser una base nucleica modificada, tal como inosina, metil-5-desoxicidina, dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada que permita la hibridación. Los nucleótidos *alfa* también pueden estar modificados a nivel del enlace internucleotídico como por ejemplo fósforotioatos, H-fosfonatos, alquil-fosfonatos o a nivel del esqueleto como por ejemplo 2' O-alkil ribosa, PNA y LNA. Preferentemente, los nucleótidos *alfa* son los descritos en la solicitud WO-A-88/04301.

30 Por “nucleótido invertido” se entiende desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que tienen una orientación inversa a la de la secuencia que los contiene. Convencionalmente, la síntesis se realizaba en el sentido 3' a 5', los nucleótidos invertidos se introducen a continuación o antes del resto de la cadena nucleotídica, en sentido 5' a 3'. La unión entre los nucleótidos invertidos y el resto de la cadena se realiza entonces mediante un enlace 5'-5' o 3'-3'. Podemos remitirnos a Koga M. et al., J. Org. Chem., 1991, 56, 3757. Los nucleótidos invertidos pueden comprender eventualmente al menos un nucleótido modificado, por ejemplo al menos un nucleótido que comprende una base nucleica modificada, tal como inosina, metil-5-desoxicidina, dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada que permita la hibridación. Los nucleótidos invertidos también pueden estar modificados a nivel del esqueleto, como por ejemplo PNA, 2' O-alkil ribosa y LNA.

35 Por “extremo”, se entiende el punto de inicio y el punto de terminación de la síntesis de un oligonucleótido generalmente definidos por el número portado por los hidroxilos libres portados por el primer o el último nucleósido es decir 3' o 5'. Se entiende que, mediante una elección apropiada de las unidades de elongación (las fosforamiditas de los nucleósidos *alfa* o *beta*, invertidos o no), puede sintetizarse un oligonucleótido en sentido 3' a 5' o el inverso, incluso, alternar durante la síntesis el sentido de la elongación. Esto conduce a oligonucleótidos que portan extremos 3'-5', 5'-3', 3'-3' o también 5'-5'.

40 En el sentido de la presente invención, se entiende por “muestra biológica”, cualquier muestra susceptible de contener ácidos nucleicos. Estas últimas pueden extraerse de tejidos, de sangre, de suero, de saliva, de células circulantes de un paciente o provenir de un producto alimentario, agroalimentario o también ser de origen medioambiental. La extracción se realiza mediante cualquier protocolo conocido por el experto en la materia, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento de aislamiento descrito en la patente EP-B-0.369.063.

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

Figura 1: Ejemplo de conformaciones completamente circulares de la sonda de acuerdo con la presente invención.

50 **T:** dT-FAM, fluoróforo

Nucleótido en minúscula: nucleótidos *alfa*

**Q:** extintor de fluorescencia

Figura 2: Ejemplo de conformaciones completamente circulares de la sonda de acuerdo con la presente invención.

55 **T:** dT-FAM, fluoróforo

Q: extintor de fluorescencia

Nucleótido en minúscula: nucleótidos invertidos

5

Figura 3: Experimento de desnaturalización térmica de la sonda de acuerdo con la invención de tipo *alfa* del modelo del virus de la gripe B, como se describe en el ejemplo 1 (emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias (RFU para *Related Fluorescence Unit* [Unidad de Fluorescencia Relativa]) en función de la temperatura medida en grados Celsius (°C)).

Figura 3a: sonda en presencia de su diana sintética.

Figura 3b: sonda en solitario sin su diana.

10

Figura 4: Experimento de desnaturalización térmica de la sonda de acuerdo con la invención de tipo *alfa* del modelo del VIH, como se describe en el ejemplo 1 (emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias (RFU) en función de la temperatura (°C)).

Figura 4a: sonda en presencia de su diana sintética.

Figura 4b: sonda en solitario sin su diana.

15

Figura 5: Experimento de desnaturalización térmica de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido del modelo del virus de la gripe B, como se describe en el ejemplo 2 (emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias (RFU) en función de la temperatura (°C)).

Figura 5a: sonda en presencia de su diana sintética.

Figura 5b: sonda en solitario sin su diana.

20

Figura 6: Experimento de desnaturalización térmica de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido del modelo del VIH, como se describe en el ejemplo 2 (emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias (RFU) en función de la temperatura (°C)).

Figura 6a: sonda en presencia de su diana sintética.

Figura 6b: sonda en solitario sin su diana.

25

Figura 7: Experimento de estudio de la especificidad de hibridación de la sonda de tipo *alfa* de acuerdo con la invención en el modelo diana de virus de la gripe B. En ordenadas se representa el valor de la temperatura de fusión medida en grados Celsius (T<sub>m</sub> por "*melting temperature*" [temperatura de fusión]) en función del número de nucleótidos complementarios (abscisas) de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB (símbolo cuadrado) o de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (símbolo redondo).

30

Figura 8: Experimento de estudio de la especificidad de hibridación de la sonda de tipo *alfa* de acuerdo con la invención en el modelo diana de HIV-1A. En ordenadas se representa el valor de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) medida en grados Celsius en función del número de nucleótidos complementarios (abscisas) de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (símbolo cuadrado) o de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Hoa8 (símbolo redondo).

35

Figura 9: Experimento de estudio de la especificidad de hibridación de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido en el modelo diana de virus de la gripe B. En ordenadas se representa el valor de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) medida en grados Celsius en función del número de nucleótidos complementarios (abscisas) de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB (símbolo cuadrado) o de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (símbolo redondo).

40

Figura 10: Experimento de estudio de la especificidad de hibridación de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido en el modelo de HIV-1A. En ordenadas se representa el valor de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) medida en grados Celsius en función del número de nucleótidos complementarios (abscisas) de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (símbolo cuadrado) o de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Hoi8 (símbolo redondo).

45

Figura 11: Estudio de la apertura prematura y no deseada de las sondas *molecular beacon* y de las sondas de acuerdo con la invención en presencia de contaminantes en el medio de reacción.

50

Figura 11a: Medición de la señal de fluorescencia de las sondas (unidad arbitraria, fluorescencia normalizada dividiendo cada valor por el valor mínimo inicial en función del tiempo (expresado en minutos) en presencia de enzima T7 ARN polimerasa.

Figura 11b: Medición de la señal de fluorescencia de las sondas (unidad arbitraria, fluorescencia normalizada dividiendo cada valor por el valor mínimo inicial en función del tiempo (expresado en minutos) en ausencia de enzima T7 ARN polimerasa.

Figura 12: Representación de las diferentes estructuras utilizadas en las sondas de acuerdo con la invención.

5 Figura 12a: Estructuras de los diferentes nucleótidos utilizados: Nucleótido 1 = nucleótido de anomería *beta*, Nucleótido 2 = nucleótido de anomería *alfa*, Nucleótido 3 = nucleótido invertido.

10 Figura 12b: Ejemplo de hibridación de una secuencia de cierre de las sondas de acuerdo con la invención cuando una de las cadenas está constituida por nucleótidos *alfa* con: **T** es dT-FAM o el fluoróforo de esta molécula; **Q** corresponde al extintor de fluorescencia; los nucleótidos en minúscula son nucleótidos *alfa* en la parte derecha de esta figura, mientras que el círculo en línea de puntos muestra estos mismo nucleótidos de anomería *alfa* en la parte izquierda de esta figura; finalmente; los nucleótidos en mayúscula, en la parte derecha de esta figura, son nucleótidos *beta* que, en la parte izquierda, contienen bases B que no están rodeadas por un círculo.

15 Figura 12c: Ejemplo de hibridación de una secuencia de cierre de las sondas de acuerdo con la invención cuando una de las cadenas está constituida por de nucleótidos invertidos con: **T**: dT-FAM, fluoróforo; **Q**: extintor de fluorescencia; nucleótido en minúscula: nucleótidos invertidos; el círculo de línea de puntos muestra el enlace 5'-5';

20 Las sondas de acuerdo con la invención, las sondas *molecular beacons* y los ácidos nucleicos diana, utilizados en el conjunto de los ejemplos a continuación, se sintetizan siguiendo el procedimiento de síntesis con fosoramiditas, conocido por el experto en la materia. El método de síntesis con fosoramiditas ha sido descrito por Beaucage y Lyer, (Tetrahedron, 48, 223-2311, 1992). Los reactivos y fosoramiditas se adquieren en el mercado, particularmente en Eurogentec S.A. (Seraing, Bélgica) y Glen Research (Sterling, Virginia, Estados Unidos). Las fosoramiditas *alfa*, utilizadas para introducir los nucleótidos modificados *alfa*, se adquieren de Chemgenes (Wilmington, MA, Estados Unidos, nº de catálogo ANP-1651, ANP-1652, ANP-1653, ANP-1654). Las fosoramiditas invertidas, utilizadas para introducir los nucleótidos invertidos, se adquieren de Glen Research (Sterling, Virginia, Estados Unidos, nº de catálogo 10-0001, 10-0101, 10-0201, 10-0301). Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC. Su pureza también se controló mediante análisis de HPLC, su identidad se controló mediante espectrometría de masas Maldi-TOF.

Los marcadores utilizados en las sondas de acuerdo con la invención y las sondas *molecular beacons* son:

- 30
- El extintor de fluorescencia Dabsilo (Glen Research, nº de cat. 20-5912), indicado como Da.
  - el fluoróforo FAM (fluoresceína-amina), Molecular Probes, nº de cat. C-2210
  - el fluoróforo FAM (fluoresceína-amina) unido a un nucleótido desoxitimina (Glen Research, nº de cat. 10-1056), indicado como dT-FAM.

35 **Ejemplo 1: Estudio de la hibridación de las sondas de acuerdo con la invención de tipo *alfa* de los modelos de virus de la gripe B y VIH con su secuencia diana.**

**Objetivos:**

El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención es capaz de producir una señal de fluorescencia mediante hibridación en presencia de una secuencia diana complementaria.

**Diseño experimental:**

40 Las sondas utilizadas son las siguientes:

Modelo de virus de la gripe B - sonda Opa6d (SEC ID Nº 1):

5'- gaccgtctg(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGAC-3'Da Modelo de VIH - sonda HOa8 (SEC ID Nº 2):

5'- accctatct(dT-FAM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG-3' Da

45 Las secuencias nucleotídicas subrayadas corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:



Modelo de virus de la gripe B, diana cC (SEC ID N° 3):

5'- TTTAGTTTTTTGGACGTCTTCTCCTTT -3'

Modelo de VIH, diana cH4 (SEC ID N° 4):

5'- TTTACTCTATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATTTT -3'

5 Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- un diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- una sonda a concentración 0,1 micromolar,
- una secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20 µl.

10 Se preparan controles negativos utilizando agua ultrapura MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

Las soluciones se calientan a 65°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración.

15 **Resultados:**

Los resultados obtenidos se representan en las figuras 3 y 4.

20 Las sondas Opa6 y Hoa8 en presencia de su secuencia diana sintética respectiva (figura 3a y 4a) presentan el perfil de fluorescencia esperado: a baja temperatura, la sonda hibrida con su diana y el fluoróforo está a una distancia máxima del extintor. La fluorescencia es máxima. A alta temperatura, la doble hélice sonda/diana se desestabiliza, la sonda se convierte en cadena sencilla y la distancia entre el fluoróforo y el extintor disminuye, provocando una disminución de la fluorescencia. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana". La Tm corresponde al punto de inflexión de la curva de fluorescencia = f(temperatura). La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de la curva. Las sondas Opa6 y Hoa8 tienen una Tm-diana (véase la tabla 1) que les permite seguir hibridadas con su diana a la temperatura de la reacción de amplificación NASBA, 41°C, y producir de este modo un máximo de señal de fluorescencia en presencia de su secuencia diana.

30 Las sondas Opa6d y Hoa8 en solitario (figura 3b y 4b) presentan el perfil de fluorescencia esperado: a baja temperatura, la sonda está estructurada en forma circular y el fluoróforo está muy cerca del extintor. La fluorescencia emitida es muy reducida. A alta temperatura, la estructura secundaria se disocia, el fluoróforo se aleja del extintor y la emisión de la fluorescencia aumenta progresivamente y alcanza un periodo de estabilidad cuando la estructura secundaria está completamente desnaturalizada. La estabilidad térmica de la estructura secundaria de la sonda viene dada por el valor de "Tm-sonda", que corresponde al punto de inflexión de la curva de fluorescencia = f(temperatura). La Tm-sonda se calcula como el máximo de la primera derivada de la curva. Las sondas Opa6d y Hoa8 tienen una Tm-sonda (véase la tabla 1) que les permite permanecer cerradas a la temperatura de la reacción de amplificación NASBA, 41°C, y producir de este modo un mínimo de fluorescencia residual en ausencia de su secuencia diana.

35 La "relación abierto/cerrado", también llamada "relación-A/C", permite medir el nivel de señal producido por una sonda en presencia de su diana a 41°C. Se calcula como la relación entre la señal producida por la sonda en presencia de su secuencia diana y la señal residual producida por la sonda en solitario.

40 En la tabla 1 se reúnen los valores de Tm-sonda, Tm-diana y relación-A/C obtenidos con las sondas descritas en este ejemplo.

Tabla 1: Valores de Tm-sonda, Tm-diana y relación-A/C

Sonda	Tm-sonda (°C)	Tm-diana (°C)	relación-A/C
<b>OPa6d</b> (SEC ID N° 1)	51,8	57,7	5,4
<b>HOa8</b> (SEC ID N° 2)	51,0	64,5	4,5

**Conclusiones:**

Las sondas de acuerdo con la invención de tipo *alfa*, de los modelos de virus de la gripe B y VIH, en solitario en solución, forman una estructura secundaria estable a 41°C, produciendo una extinción de la señal de fluorescencia debido a la proximidad del fluoróforo y del extintor.

- 5 Cuando están en solución en presencia de su secuencia diana sintética, hibridan con sus secuencias diana sintéticas, produciendo una señal de fluorescencia medible.

**Ejemplo 2: Estudio de la hibridación de las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido de los modelos de virus de la gripe B y VIH con su secuencia diana.**

**Objetivos:**

- 10 El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda modificada de acuerdo con la invención es capaz de producir una señal de fluorescencia mediante hibridación en presencia de una secuencia diana complementaria.

**Diseño experimental:**

Las sondas utilizadas son las siguientes:

Modelo de virus de la gripe B - sonda Opi6d (SEC ID N° 5):

- 15 **5'-Da -GGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGA-3'-(dT-FAM)-3'-cctcttctg-5'**

Modelo de VIH - sonda HOi8d (SEC ID N° 6):

**5'-Da -CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG-3'-(dT-FAM)-3'-ggtagtactc-5'**

Las secuencias subrayadas corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos invertidos.

- 20 Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

Modelo de virus de la gripe B, diana cC (SEC ID N° 3):

**5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCTTT -3'**

Modelo de VIH, diana CH4 (SEC ID N° 4):

**5'- TTTACTCTATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATTTT -3'**

- 25 Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- un diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- una sonda a concentración 0,1 micromolar,
- una secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20 µl.

- 30 Se preparan controles negativos utilizando agua ultrapura MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

Las soluciones se calientan a 65°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. Los resultados se expresan en forma de gráfico de temperatura frente a fluorescencia.

- 35 **Resultados:**

Los resultados obtenidos se representan en las figuras 5 y 6.

- 40 Las sondas Opi6 y Hoi8d en presencia de su secuencia diana sintética respectiva (figura 5a y 6a) presentan el perfil de fluorescencia esperado: a baja temperatura, la sonda hibrida con su diana formando una doble hélice suficientemente rígida para separar el fluoróforo del extintor. En esta doble hélice, las dos moléculas se encuentran a una distancia máxima una de la otra. La fluorescencia emitida es máxima.

A alta temperatura, la doble hélice sonda/diana se disocia, la sonda se vuelve entonces de cadena sencilla. En este caso, incluso aunque la estructura secundaria en esta sonda se disocia, la distancia entre el fluoróforo y el extintor

es inferior a aquella en la doble hélice sonda/diana a causa de la flexibilidad de la sonda desnaturalizada. Esto induce una disminución de la fluorescencia por extinción. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana" que corresponde al punto de inflexión de la curva de fluorescencia = f(temperatura). La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de la curva. Las sondas Opi6 y Hoi8d tienen una Tm-diana (véase la tabla 2) que les permite seguir hibridadas con su diana a la temperatura de la reacción de amplificación NASBA, 41°C, y producir de este modo un máximo de señal de fluorescencia en presencia de su secuencia diana.

Las sondas Opi6d y Hoi8d en solitario (figura 5b y 6b) presentan el perfil de fluorescencia esperado: a baja temperatura, la sonda está estructurada en forma circular y el fluoróforo está muy cerca del extintor. La fluorescencia emitida es muy reducida. A alta temperatura, la estructura secundaria se disocia, el fluoróforo se aleja del extintor y la emisión de la fluorescencia aumenta progresivamente y alcanza un periodo de estabilidad cuando la estructura secundaria está completamente desnaturalizada. La estabilidad térmica de la estructura secundaria de la sonda viene dada por el valor de "Tm-sonda", que corresponde al punto de inflexión de la curva. La Tm-sonda se calcula como el máximo de la primera derivada de la curva de fluorescencia = f(temperatura). Las sondas Opi6d y Hoi8d tienen una Tm-sonda (véase la tabla 2) que les permite permanecer cerradas a la temperatura de la reacción de amplificación NASBA, 41°C, y producir de este modo un mínimo de fluorescencia residual en ausencia de su secuencia diana.

La "relación abierto/cerrado", también llamada "relación-A/C", permite medir el nivel de señal producido por una sonda en presencia de su diana a 41°C. Se calcula como la relación entre la señal producida por la sonda en presencia de su secuencia diana y la señal residual producida por la sonda en solitario.

En la tabla 2 se reúnen todos los valores de Tm-sonda, Tm-diana y relación-A/C obtenidos con las sondas descritas en este ejemplo.

Tabla 2: Valores de Tm-sonda, Tm-diana y relación-A/C

Sonda	Tm-sonda (°C)	Tm-diana (°C)	relación-O/F
OPI6d (SEC ID N° 5)	48,5	59,7	5,3
HOI8d (SEC ID N° 6)	48,6	64,0	3,7

### Conclusiones:

Las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido de los modelos de virus de la gripe B y VIH, en solitario en solución, forman una estructura secundaria estable a 41°C, produciendo una extinción de la señal de fluorescencia debido a la proximidad del fluoróforo y del extintor.

Cuando están en solución en presencia de su secuencia diana sintética, hibridan con sus secuencias diana sintéticas produciendo una señal de fluorescencia medible.

### **Ejemplo 3: Estudio de la detección en tiempo real durante la amplificación NASBA de la diana de virus de la gripe B mediante las sondas de acuerdo con la invención de tipo alfa.**

#### **Objetivos:**

El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención es capaz de detectar su secuencia diana en tiempo real durante la amplificación NASBA.

#### **Diseño experimental:**

La secuencia diana de la amplificación es un ARN de una longitud de 212 nucleótidos, sintetizado por transcripción a partir de un plásmido de acuerdo con una técnica de transcripción *in vitro* conocida por el experto en la materia. La secuencia de este ARN corresponde a una secuencia del genoma del virus de la gripe B.

Los cebadores y sondas utilizados son los siguientes:

Cebadores:

P1 (SEC ID N° 7):

5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTCTGCTTTAGCACTTCCA -3'

P2 (SEC ID N° 8):

5'- GAGAAATGCAGATGGTCTCAGCTA -3'

Sonda Opa6d (SEC ID Nº 1):

5'- gaccgtctg(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGAC-3' Da

5 El segmento en cursiva del cebador P1 corresponde a la secuencia del promotor reconocido por la enzima T7 ARN polimerasa, necesario para la amplificación enzimática *in vitro* NASBA.

Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

Los nucleótidos escritos en minúscula en la sonda Opa6d corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

10 El segmento en 3' del cebador P1 es complementario de una secuencia del ARN diana. La secuencia del cebador P2 es igual a una secuencia del ARN diana situada en el lado 5' de la secuencia complementaria del cebador P1. La reacción de amplificación NASBA generará una multitud de copias de una secuencia de ARN, llamada "amplicón", cuya secuencia corresponde a la secuencia complementaria del ARN diana, en el segmento comprendido entre la secuencia de hibridación del cebador P1 y la secuencia igual a la secuencia del cebador P2. Las sondas de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de reconocimiento que hibridará con los amplicones generados por la  
15 reacción de amplificación NASBA. Debido a esto, la señal producida por la sonda es detectada solamente cuando la secuencia de ARN diana está presente en la mezcla de reacción y es amplificada por NASBA con los cebadores seleccionados.

La reacción de amplificación NASBA se realiza con ayuda de los reactivos "NASBA basic kit" (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 60079136 & 60085192) y en las condiciones recomendadas por el fabricante. Cada tubo de amplificación contiene un volumen final de 20 µl, que se compone de la siguiente manera:

- 20
- 8,64 µl de los reactivos "NASBA basic kit" en las proporciones recomendadas por el fabricante,
  - 0,4 µl de cebador P1 a 10 µM,
  - 0,4 µl de cebador P2 a 10 µM,
  - 0,16 µl de la sonda Opa6d a 10 µM,
  - 5 µl de la diana de ARN a una concentración suficiente para obtener una concentración final de 5,  
25 50, 500 ó 5000 copias por tubo de reacción.

En todos los casos, se realiza un control negativo que contiene agua "DNase/RNase free" (nº de catálogo 32739, ACROS). Todos los experimentos se realizan por duplicado.

30 Después de una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 65°C y después una incubación de 2 minutos a 41°C, 5 µl del reactivo "enzyme mix" (1 microesfera de tipo accosphere "enzyme" 60085111 por 45 µl de diluyente "enzyme" 60085192, parte del "NASBA basic kit") se añaden a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se introduce a continuación en el lector de fluorescencia cuya temperatura se ha fijado a 41°C y se realiza el seguimiento de la reacción gracias al programa Director 2.0 del lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V, Boxtel, Países Bajos), con lectura de la fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM durante 90 minutos a 520 nm.

35 Al finalizar la reacción, se obtiene un perfil gráfico de detección para cada tubo, con los valores numéricos de "Alpha3" y "MSR". El valor "Alpha3" es "el plazo de agotamiento de los cebadores" tal como se ha descrito en el artículo de Weusten et al. (Nucleic Acids Research 2002, vol. 30, Nº 6, e26). Este valor corresponde al tiempo en el cual el aumento de la señal de fluorescencia comienza a ser detectable. Cuanto más rápida y, por lo tanto eficaz, sea la amplificación, más corto es el valor de Alpha3.

40 El valor "MSR" es la "Relación máxima de la señal". Este valor corresponde a la relación entre el valor de fluorescencia leído al finalizar la reacción de amplificación y el valor de fluorescencia final teórica extrapolada en los valores iniciales, antes del comienzo del aumento de la señal. Este valor es el nivel de señal procurado por la sonda, y debe ser superior a 1 para que la señal pueda ser considerada positiva. Estos dos valores se calculan y se muestran automáticamente mediante el programa del lector EasyQ para cada muestra.

### **Resultados:**

45 Los resultados de detección en NASBA en tiempo real no se muestran pero están disponibles en caso necesario. Puede observarse que el límite de detección se sitúa a 5 copias de transcrito diana. Las muestras positivas producen una señal detectable con un "MSR" óptimo de 4,47 y un valor de "Alpha3" entre 23 y 31 minutos.

**Conclusiones:**

5 La sonda Opa6d de acuerdo con la invención es capaz de emitir una señal de fluorescencia detectable en presencia de su diana en solución, caracterizada por un nivel óptimo de señal de 4,47 ("MSR"). El valor de "Alpha3", que marca el tiempo en el que la señal se vuelve detectable, se sitúa entre 23 y 31 minutos. El "Alpha3" es proporcional a la cantidad de diana presente, lo que da la posibilidad de cuantificar la diana a partir de este valor.

**Ejemplo 4: Estudio de la detección en tiempo real durante la amplificación NASBA de la diana de virus de la gripe B mediante las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido.****Objetivos:**

10 El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención es capaz de detectar su secuencia diana en tiempo real durante la amplificación NASBA.

**Diseño experimental**

La secuencia diana de la amplificación es un ARN de una longitud de 212 nucleótidos, sintetizado por transcripción a partir de un plásmido de acuerdo con una técnica de transcripción *in vitro* conocida por el experto en la materia. La secuencia de este ARN corresponde a una secuencia del genoma del virus de la gripe B.

15 Los cebadores y sondas utilizados son los siguientes:

Cebadores:

P1 (SEC ID Nº 7):

5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTCTGCTTTAGCACTTCCA -3'

P2 (SEC ID Nº 8):

20 5'- GAGAAATGCAGATGGTCTCAGCTA -3'

Sonda Opi6d (SEC ID Nº 5):

5'-Da - GGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGA-(dT-FAM)- 3'-3'-**cctctctg**-5'

Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

25 El segmento en cursiva del cebador P1 corresponde a la secuencia del promotor reconocido por la enzima T7 ARN, polimerasa, necesario para la amplificación enzimática *in vitro* NASBA. Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en la sonda Opi6d corresponden a nucleótidos invertidos.

30 El segmento en 3' del cebador P1 es complementario de una secuencia del ARN diana. La secuencia del cebador P2 es igual a una secuencia del ARN diana situada en el lado 5' de la secuencia complementaria del cebador P1. La reacción de amplificación NASBA generará una multitud de copias de una secuencia de ARN, llamada "amplicón", cuya secuencia corresponde a la secuencia complementaria del ARN diana, en el segmento comprendido entre la secuencia de hibridación del cebador P1 y la secuencia igual a la secuencia del cebador P2. Las sondas de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de reconocimiento que hibridará con los amplicones generados por la reacción de amplificación NASBA. Debido a esto, la señal producida por la sonda es detectada solamente cuando la secuencia de ARN diana está presente en la mezcla de reacción y es amplificada por la NASBA con los cebadores seleccionados.

35 La reacción de amplificación NASBA se realiza con ayuda de los reactivos "NASBA basic kit" (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref.: 60079136 y 60085192) y en las condiciones recomendadas por el fabricante. Cada tubo de amplificación contiene un volumen final de 20 µl, que se compone de la siguiente manera:

- 8,64 µl de los reactivos "NASBA basic kit" en las proporciones recomendadas por el fabricante,
- 40 • 0,4 µl de cebador P1 a 10 µM,
- 0,4 µl de cebador P2 a 10 µM,
- 0,16 µl de la sonda Opi6d a 10 µM,
- 5 µl de la diana ARN a una concentración suficiente para obtener una concentración final de 5, 50, 500 ó 5000 copias por tubo de reacción.

En todos los casos, se realiza un control negativo que contiene agua “*DNase/RNase free*” (nº de catálogo 32739, ACROS).

5 Después de una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 65°C y después una incubación de 2 minutos a 41°C, 5 µl del reactivo “enzyme mix” (1 microesfera de tipo *accusphere* “enzyme” ref. 60085111 por 45 µl de diluyente “enzyme” ref. 60085192, parte del “NASBA basic kit”) se añaden a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se introduce a continuación en el lector de fluorescencia cuya temperatura se ha fijado a 41°C y se realiza el seguimiento de la reacción con el programa Director 2.0 del lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos), con lectura de la fluorescencia del fluoróforo FAM durante 90 minutos a 520 nm.

10 Al finalizar la reacción, se obtiene un perfil gráfico de detección para cada tubo, junto con los valores numéricos de “Alpha3” y “MSR”.

#### **Resultados:**

Los resultados de detección en NASBA en tiempo real no se muestran pero están disponibles en caso necesario. Puede observarse que el límite de detección se sitúa a 5 copias de transcrito diana. Las muestras positivas producen una señal detectable con un “MSR” óptimo de 3,88 y un valor de “Alpha3” entre 18 y 26 minutos.

#### **Conclusiones:**

La sonda Opi6d de acuerdo con la invención es capaz de emitir una señal de fluorescencia detectable en presencia de su diana en solución, caracterizada por un nivel óptimo de señal de 3,88 (“MSR”). El valor de “Alpha3”, que marca el tiempo en el que la señal se vuelve detectable, se sitúa entre 18 y 26 minutos. El “Alpha3” es proporcional a la cantidad de diana presente, lo que da la posibilidad de cuantificar la diana a partir de este valor.

#### **Ejemplo 5: Estudio de la detección en tiempo real durante la amplificación NASBA de la diana de VIH mediante las sondas de acuerdo con la invención de tipo alfa.**

##### **Objetivos:**

El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención es capaz de detectar su secuencia diana en tiempo real durante la amplificación NASBA.

##### **Diseño experimental:**

La secuencia diana de la amplificación es un ARN de una longitud de 212 nucleótidos, sintetizado por transcripción a partir de un plásmido de acuerdo con una técnica de transcripción *in vitro* conocida por el experto en la materia. La secuencia de este ARN corresponde a una secuencia del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana “VIH”.

Los cebadores y sondas utilizados son los siguientes:

30 Cebadores:

P3 (SEC ID Nº 9):

5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGCTATGTCACCTCCCCTTGGTTCTCTCA -3'

P4 (SEC ID Nº 10):

5'- AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA -3'

35 Sonda Hoa6 (SEC ID Nº 11):

5'- accctatcc-(dT-FAM)-ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGG -3'-Da

Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

40 El segmento en cursiva del cebador P3 corresponde a la secuencia del promotor reconocida por la enzima T7 ARN polimerasa, necesaria para la amplificación enzimática *in vitro* NASBA. Los nucleótidos escritos en minúscula en la sonda Hoa6 corresponden a nucleótidos *alfa*.

45 El segmento en 3' del cebador P3 es complementario de una secuencia del ARN diana. La secuencia del cebador P4 es igual a una secuencia del ARN diana situada en el lado 5' de la secuencia complementaria del cebador P3. La reacción de amplificación NASBA generará una multitud de copias de una secuencia de ARN, llamada “amplicón”, cuya secuencia corresponde a la secuencia complementaria del ARN diana, en el segmento comprendido entre la secuencia de hibridación del cebador P3 y la secuencia igual a la secuencia del cebador P4. Las sondas de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de reconocimiento que hibridará con los amplicones generados por la reacción de amplificación NASBA. Debido a esto, la señal producida por la sonda es detectada solamente cuando la

secuencia de ARN diana está presente en la mezcla de reacción y es amplificada por la NASBA con los cebadores seleccionados.

La reacción de amplificación NASBA se realiza con ayuda de los reactivos "NASBA basic kit" (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 60079136 y 60085192) y en las condiciones recomendadas por el fabricante. Cada tubo de amplificación contiene un volumen final de 20 µl, que se compone de la siguiente manera:

- 5
- 8,64 µl de los reactivos "NASBA basic kit" en las proporciones recomendadas por el fabricante,
  - 0,4 µl de cebador P3 a 10 µM,
  - 0,4 µl de cebador P4 a 10 µM,
  - 0,16 µl de la sonda Hoa6 a 10 µM,
- 10
- 5 µl de la diana ARN a una concentración suficiente para obtener una concentración final de 5, 50, 500 ó 5000 copias por tubo de reacción.

En todos los casos, se realiza un control negativo que contiene agua "*DNase/RNase free*" (nº de catálogo 32739, ACROS).

15

Después de una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 65°C y después una incubación de 2 minutos a 41°C, 5 µl del reactivo "enzyme mix" (1 microesfera de tipo accusphere "enzyme" ref. 60085111 por 45 µl de diluyente "enzyme" ref. 60085192, parte del "NASBA basic kit") se añaden a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se introduce a continuación en el lector de fluorescencia cuya temperatura se ha fijado a 41°C y se realiza el seguimiento de la reacción con el programa Director 2.0 del lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos), con lectura de la fluorescencia del fluoróforo FAM durante 90 minutos a 520 nm.

20

Al finalizar la reacción, se obtiene un perfil gráfico de detección para cada tubo, junto con los valores numéricos de "Alpha3" y "MSR".

#### **Resultados:**

25

Los resultados de detección en NASBA en tiempo real no se muestran pero están disponibles en caso necesario. Puede observarse que el límite de detección es igual o inferior a 5 copias de transcrito diana. Las muestras positivas producen una señal detectable con un "MSR" óptimo de 2,53 y un valor de "Alpha3" entre 14 y 22 minutos.

#### **Conclusiones:**

30

La sonda Hoa6 de acuerdo con la invención es capaz de emitir una señal de fluorescencia detectable en presencia de su diana en solución, caracterizada por un nivel óptimo de señal de 2,53 ("MSR"). El valor de "Alpha3", que marca el tiempo en el que la señal se vuelve detectable, se sitúa entre 14 y 22 minutos. El "Alpha3" es proporcional a la cantidad de diana presente, lo que da la posibilidad de cuantificar la diana a partir de este valor.

#### **Ejemplo 6: Estudio de la detección en tiempo real durante la amplificación NASBA de la diana de VIH mediante las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido.**

#### **Objetivos:**

35

El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención es capaz de detectar su secuencia diana en tiempo real durante la amplificación NASBA.

#### **Diseño experimental:**

La secuencia diana de la amplificación es un ARN de una longitud de 212 nucleótidos, sintetizado por transcripción a partir de un plásmido de acuerdo con una técnica de transcripción *in vitro* conocida por el experto en la materia. La secuencia de este ARN corresponde a una secuencia del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana "VIH".

40

Los cebadores y sondas utilizados son los siguientes:

Cebadores:

P3 (SEC ID Nº 9):

5'- AATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGCTATGTCACCTCCCCTTGGTTCTCTCA -3'

P4 (SEC ID Nº 10):

45

5'- AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA -3'

Sonda Hoi6d (SEC ID N° 12):

5'-Da- CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGG-3'-(dT-FAM) 3'-***ggtagtact*** -5'

Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos invertidos.

- 5 El segmento en cursiva del cebador P3 corresponde a la secuencia del promotor reconocida por la enzima T7 ARN polimerasa, necesaria para la amplificación enzimática *in vitro* NASBA. Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en la sonda Hoi6d corresponden a nucleótidos invertidos.

- 10 El segmento en 3' del cebador P3 es complementario de una secuencia del ARN diana. La secuencia del cebador P4 es igual a una secuencia del ARN diana situada en el lado 5' de la secuencia complementaria del cebador P3. La reacción de amplificación NASBA generará una multitud de copias de una secuencia de ARN, llamada "amplicón", cuya secuencia corresponde a la secuencia complementaria del ARN diana, en el segmento comprendido entre la secuencia de hibridación del cebador P3 y la secuencia igual a la secuencia del cebador P4. Las sondas de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de reconocimiento que hibridará con los amplicones generados por la reacción de amplificación NASBA. Debido a esto, la señal producida por la sonda es detectada solamente cuando la secuencia de ARN diana está presente en la mezcla de reacción y es amplificada por la NASBA con los cebadores seleccionados.

15 La reacción de amplificación NASBA se realiza con ayuda de los reactivos "NASBA basic kit" (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 60079136 y 60085192) y en las condiciones recomendadas por el fabricante. Cada tubo de amplificación contiene un volumen final de 20 µl, que se compone de la siguiente manera:

- 20
- 8,64 µl de los reactivos "NASBA basic kit" en las proporciones recomendadas por el fabricante,
  - 0,4 µl de cebador P3 a 10 µM,
  - 0,4 µl de cebador P4 a 10 µM,
  - 0,16 µl de la sonda Hoi6d a 10 µM,
- 25
- 5 µl de la diana ARN a una concentración suficiente para obtener una concentración final de 5, 50, 500 ó 5000 copias por tubo de reacción.

En todos los casos, se realiza un control negativo que contiene agua "DNase/RNase free" (n° de catálogo 32739, ACROS).

- 30 Después de una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 65°C y después una incubación de 2 minutos a 41°C, 5 µl del reactivo "enzyme mix" (1 microesfera de tipo accusphere "enzyme" ref. 60085111 por 45 µl de diluyente "enzyme" ref. 60085192, parte del "NASBA basic kit") se añaden a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se introduce a continuación en el lector de fluorescencia cuya temperatura se ha fijado a 41°C y se realiza el seguimiento de la reacción con el programa Director 2.0 del lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos), con lectura de la fluorescencia del fluoróforo FAM durante 90 minutos a 520 nm.

- 35 Al finalizar la reacción, se obtiene un perfil gráfico de detección para cada tubo con los valores numéricos de "Alpha3" y "MSR".

#### **Resultados:**

Los resultados de detección en NASBA en tiempo real no se muestran pero están disponibles en caso necesario. Puede observarse que el límite de detección es igual o inferior a 5 copias de transcrito diana. Las muestras positivas producen una señal detectable con un "MSR" óptimo de 2,03 y un valor de "Alpha3" entre 15 y 21 minutos.

- 40 **Conclusiones:**

La sonda Hoi6d de acuerdo con la invención es capaz de emitir una señal de fluorescencia detectable en presencia de su diana en solución, caracterizada por un nivel óptimo de señal de 2,03 ("MSR"). El valor de "Alpha3", que marca el tiempo en el que la señal se vuelve detectable, se sitúa entre 15 y 21 minutos. El "Alpha3" es proporcional a la cantidad de diana presente, lo que da la posibilidad de cuantificar la diana a partir de este valor.



**Ejemplo 7: Estudio de la especificidad de las sondas de acuerdo con la invención en el modelo de virus de la gripe B.****Objetivos:**

5 La especificidad de una sonda es su capacidad para reconocer únicamente su diana y, de este modo, para diferenciarla de una diana que comprende, por ejemplo, emparejamientos erróneos o deleciones. Las sondas *molecular beacons* son hoy en día las sondas moleculares más específicas, ya que permiten la diferenciación de dos dianas que poseen solamente un nucleótido diferente. El objetivo de este experimento es mostrar el nivel de especificidad de las sondas de acuerdo con la invención, en comparación con la sonda *molecular beacon* que contiene la misma secuencia de reconocimiento.

**Diseño experimental:**

Las sondas utilizadas son las siguientes:

10 *Molecular beacon* CP InfB (SEC ID N° 13):

5'- (FAM)-CGATCGGGGAGAAGACGTCCAAAACTCGATCG -3' Da

Sonda Opa6 (SEC ID N° 14):

5'- gagcgtagc(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTCGCATCG -3' Da

Sonda Opa5 (SEC ID N° 15):

15 5'- gagctagc(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTCGATCG-3' Da

Sonda Opi4 (SEC ID N° 16):

3'- gagctagc-5'-5'-(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTCGATCG -3' Da

Sonda Opi3 (SEC ID N° 17):

3'- gctagcc-5'-5'-(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTCGATCGG -3' Da

20 Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención y a las secuencias de las cadenas que forman la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos invertidos.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

25 Diana cC (SEC ID N° 3):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCTTT -3'

Diana cG (SEC ID N° 18):

5'- TTTAGTTTTTGGAGGTCTTCTCCTTT -3'

Diana cA (SEC ID N° 19):

30 5'- TTTAGTTTTTGGAAAGTCTTCTCCTTT -3'

Diana cT (SEC ID N° 20):

5'- TTTAGTTTTTGGATGTCTTCTCCTTT -3'

35 La secuencia diana sintética "cC" es perfectamente complementaria de una parte de las secuencias de las sondas. Las secuencias diana sintéticas "cG", "cA" y "cT" contienen un emparejamiento erróneo con respecto a la secuencia complementaria en las sondas, señalado mediante el subrayado de la letra correspondiente.

Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Un diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- Una sonda a concentración 0,1 micromolar,

- Una secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20  $\mu$ l.

Se preparan controles negativos utilizando agua ultrapura MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

- 5 Las soluciones se calientan a 65°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. Los resultados se expresan en forma de gráfico de temperatura (en °C) frente a fluorescencia (en RFU).

### **Resultados:**

- 10 Entre las sondas ensayadas para el modelo de virus de la gripe B, OPa6 es la que presenta la mayor diferencia de Tm-diana entre la diana perfecta (cC) y las dianas que poseen un emparejamiento erróneo (cG, cA o cT).

**Tabla 3:** Tm analítica de las sondas del modelo del virus de la gripe B (las dos primeras columnas de la izquierda) y diferencia obtenida entre las Tm diana con la diana perfecta (cC) y las dianas que poseen un emparejamiento erróneo (columnas cG y  $\Delta$  TmcG; cA  $\Delta$  Tm cA; cT y  $\Delta$  Tm cT).

	Tm tallo	Tm diana cC (SEC ID N° 3)	Tm diana cG (SEC ID N° 18)		Tm diana cA (SEC ID N° 19)		Tm diana cT (SEC ID N° 20)	
				$\Delta$ Tm		$\Delta$ Tm		$\Delta$ Tm
CP InfB (SEC ID N° 13)	49,7	57,7	51,0	-6,7	50,2	-7,5	48,2	-9,5
Opa 6 (SEC ID N° 14)	48,8	57,5	49,8	-7,6	48,5	-8,9	47,1	-10,4
Opa 5 (SEC ID N° 15)	45,1	57,6	51,8	-5,8	51,2	-6,4	48,9	-8,8
Opi 4 (SEC ID N° 16)	51,8	57,1	49,7	-7,3	48,9	-8,1	47,0	-10,1
Opi 3 (SEC ID N° 17)	49,5	57,5	49,8	-7,7	47,7	-10,0	50,6	-6,9

- 15 Esta tabla recoge las Tm medidas a partir de los gráficos obtenidos. En la figura 9 se representan dos ejemplos de estos gráficos. La diferencia entre la Tm-diana de la sonda con su diana perfecta y las Tm-diana de la sonda con las dianas que poseen un emparejamiento erróneo es muy visible en los gráficos y puede alcanzar 10°C para las sondas OPI4 y OPa6. Estando la Tm-diana de la sonda con las dianas que poseen un emparejamiento erróneo muy próxima a la Tm-tallo de la sonda, ésta se cierra sobre sí misma antes de hibridar con su diana.
- 20

### **Conclusiones:**

- 25 Las sondas de acuerdo con la invención son sondas específicas de una diana dada, sus prestaciones en este campo son similares a las de la sonda *molecular beacon* de referencia. Esto representa un interés principal para la detección de los SNP o *Single Nucleotide Polymorphisms* [polimorfismos de nucleótido único] que corresponden a la variación de un único nucleótido en un gen dado.

### **Ejemplo 8: Estudio de la especificidad de las sondas de acuerdo con la invención en el modelo de VIH.**

#### **Objetivos:**

- 30 La especificidad de una sonda es su capacidad para reconocer únicamente su diana y, de este modo, para diferenciarla de una diana que comprende por ejemplo emparejamientos erróneos o deleciones. Las sondas *molecular beacon* son hoy en día las sondas moleculares más específicas ya que permiten la diferenciación de dos dianas que poseen solamente un nucleótido diferente. El objetivo de este experimento es mostrar el nivel de

especificidad de las sondas de acuerdo con la invención, en comparación con la sonda *molecular beacon* que contiene la misma secuencia de reconocimiento.

**Diseño experimental:**

Las sondas utilizadas son las siguientes:

5 *Molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21):

5' (FAM)-CTATCCCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG-3' Da

Sonda Hoa6 (SEC ID N° 11):

5'-accctatcc(dT-FAM)ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGG- 3' Da

Hoa7 (SEC ID N° 22):

10 5'-ttaccctatc(dT-FAM)ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG- 3' Da

Sonda HOa8 (SEC ID N° 2):

5'-accctatctc(dT-FAM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG- 3' Da

Sonda Hoi6d (SEC ID N° 12):

5'-Da-CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGG-3'-(dT-FAM)-3'-**ggtagtact**-5'

15 Sonda Hoi7d (SEC ID N° 23):

5'-Da-CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGG-3'-(dT-FAM)-3'-**ggtagtactc**-5'

Sonda Hoi8d (SEC ID N° 6):

5'-Da-CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG-3'-(dT-FAM)-3'-**ggtagtactc**-5'

20 Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención y a las secuencias de las cadenas que forman la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*. Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas de acuerdo con la invención corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas de acuerdo con la invención corresponden a nucleótidos invertidos.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

25 Diana cH5 (SEC ID N° 24):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTT -3'

Diana cGH5 (SEC ID N° 25):

5'- TTTCATTCTGCAGGTTTCCTCATTT -3'

Diana cAH5 (SEC ID N° 26):

30 5'- TTTCATTCTGCAGATTTCCTCATTT -3'

Diana cTH5 (SEC ID N° 27):

5'- TTTCATTCTGCAGTTTTCCTCATTT -3'

35 La secuencia diana sintética "cH5" es perfectamente complementaria de una parte de las secuencias de las sondas. Las secuencias diana sintéticas "cGH5", "cAH5" y "cTH5" contienen un emparejamiento erróneo con respecto a la secuencia complementaria en las sondas, señalado mediante el subrayado de la letra correspondiente.

Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Un diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352).
- Una sonda a concentración 0,1 micromolar.
- Una secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20  $\mu$ l.

Se preparan controles negativos utilizando agua ultrapura MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

- 5 Las soluciones se calientan a 65°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide durante toda la refrigeración a 520 nm. Los resultados se expresan en forma de gráfico de temperatura frente a fluorescencia.

### **Resultados:**

Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en la figura 10.

- 10 **Tabla 4:** Valores de Tm-diana de la sonda *molecular beacon* y de las sondas de acuerdo con la invención de tipo *alfa* e invertido con la diana perfecta cH5 (dos primeras columnas de la izquierda) y diferencia obtenida entre la Tm-diana de las sondas con la diana perfecta (cH5) y las Tm-diana de las sondas con las dianas que poseen un emparejamiento erróneo (cAH5, cGH5, cTH5) (columnas  $\Delta$  Tm cAH5;  $\Delta$  Tm cGH5;  $\Delta$  Tm cTH5).

	Tm tallo cH5 (SEC ID N° 24)	Tm diana cH5 (SEC ID N° 24)	$\Delta$ Tm cGH5 (SEC ID N° 25)	$\Delta$ Tm cAH5 (SEC ID N° 26)	$\Delta$ Tm cTH5 (SEC ID N° 27)
HIV-1A (SEC ID N° 21)	50,9	58,0	-6,1	-7,3	-8,5
HOa6 (SEC ID N° 11)	49,0	58,3	-6,4	-7,5	-8,8
HOa7 (SEC ID N° 22)	44,2	58,4	-6,5	-7,7	-8,9
HOa8 (SEC ID N° 2)	49,9	58,4	-6,5	-7,7	-8,9
Hoi6d (SEC ID N° 12)	44,1	58,5	-6,7	-7,8	-9,1
Hoi7d (SEC ID N° 23)	48,3	58,5	-6,6	-7,8	-9,0
Hoi8d (SEC ID N° 6)	48,6	58,4	-6,5	-7,7	-8,9

- 15 Esta tabla recoge las Tm medidas a partir de los gráficos obtenidos. En la figura 10 se representan dos ejemplos de estos gráficos. La diferencia entre la Tm con la diana perfectamente complementaria y las Tm con las dianas que contienen un emparejamiento erróneo es muy visible y puede alcanzar 9°C para las sondas HOi6d y HOi7d.

### **Conclusiones:**

- 20 Las sondas de acuerdo con la invención son sondas específicas de una diana dada, sus prestaciones en este campo superan incluso las de la sonda *molecular beacon* de referencia HIV-1A. Esto representa un interés principal para la detección de los SNP o *Single Nucleotide Polymorphisms* que corresponden a la variación de un único nucleótido en un gen dado.

### **Ejemplo 9: Estudio de la hibridación específica de las sondas de acuerdo con la invención de tipo *alfa* del modelo del virus de la gripe B con su diana.**

#### **Objetivos:**

- 25 El objetivo de este experimento es demostrar que una sonda de acuerdo con la invención hibrida con un ácido nucleico diana de manera más específica que una sonda *molecular beacon*.

- 30 De manera general, durante el diseño de una sonda *molecular beacon*, la Tm tomada en consideración es la calculada a partir de la secuencia de reconocimiento, secuencia complementaria de la secuencia diana (Tm calculada). En efecto, se supone que las secuencias de las cadenas que forman la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* no hibridan con el ácido nucleico diana. Ahora bien, la Tm real de la sonda *molecular beacon* puede ser ligeramente superior a la que se ha calculado, debido a las interacciones de las secuencias de las cadenas que forman la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* con la secuencia diana. Además, las cadenas

que forman la parte de "tallo" pueden hibridar de forma no específica con la secuencia de la diana, lo que tiene el efecto de aumentar la estabilidad global de la hibridación de la sonda *molecular beacon* con la diana (la T<sub>m</sub>-diana real es superior a la T<sub>m</sub>-diana calculada) y de reducir de este modo la especificidad de esta hibridación.

**Diseño experimental:**

5 Las sondas utilizadas son las siguientes:

Sonda Opa6d (SEC ID N° 1):

5'- gaccgtctg(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGAC-3' Da

*Molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13):

5'- (FAM)-CGATCGGGGAGAAGACGTCCAAAACTCGATCG -3'Da

10 Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o a las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

Diana Bioa2I (SEC ID N° 28):

15 5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCTTTTCCAATT -3'

Diana 6Ba2I (SEC ID N° 29):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCCGATCGAATT -3'

Diana 10Pa2I (SEC ID N° 30):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCACAGACGGTC -3'

20 Diana 6Pa2I (SEC ID N° 31):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCACAGACAATT -3'

Diana 1Ba2I (SEC ID N° 32):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCCTTTCCAATT -3'

Diana 1Pa2I (SEC ID N° 33):

25 5'- TTTAGTITTTGGACGTCTTCTCCATTTCCAATT -3'

Diana 2Ba2I (SEC ID N° 34):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCCGTTCCAATT -3'

Diana 2Pa2I (SEC ID N° 35):

5'- TTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCACTTCCAATT -3'

30 La secuencia subrayada en línea de puntos corresponde a la parte hibridable con la secuencia de reconocimiento de la sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13), o de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1).

La secuencia Bioa21 (SEC ID N° 28) corresponde a un fragmento de la secuencia diana biológica del virus de la gripe B.

35 La secuencia diana 6Ba2I (SEC ID N° 29) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioa2I (SEC ID N° 28), seis nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos seis nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13).

40 La secuencia diana 10Pa2I (SEQ ID 30) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioa2I (SEC ID N° 28), diez nucleótidos en 3' de la secuencia resaltada con línea de puntos. Estos diez nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1).

La secuencia diana 6Pa2I (SEC ID N° 31) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioa2I (SEC ID N° 28), seis nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos seis nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1).

5 La secuencia diana 1Ba2I (SEC ID N° 32) contiene, con respecto a la secuencia Bioa2I (SEC ID N° 28), un nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con un trazo doble, es complementario de un nucleótido de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13).

10 La secuencia diana IPa2I (SEC ID N° 33) contiene, con respecto a la secuencia Bioa2I (SEC ID N° 28), un nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con un trazo doble, es complementario de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1).

15 La secuencia diana 2Ba2I (SEC ID N° 34) contiene, con respecto a la secuencia Bioa2I (SEC ID N° 28), dos nucleótidos en 3' de la secuencia resaltada con línea de puntos. Estos dos nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13).

La secuencia diana 2Pa2I (SEC ID N° 35) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioa2I (SEC ID N° 28), dos nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos dos nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1).

20 Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Diluyente basic kit (bioMérieux B.V, Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- Sonda a concentración 0,1 micromolar,
- Secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20 µl.

25 Se realizan controles negativos con agua en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

30 Las soluciones se calientan a 68°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V, Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana" que corresponde al punto de inflexión de la curva de fluorescencia = f(temperatura). La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de esta curva.

### **Resultados:**

35 Los resultados se presentan en la tabla 5 y en la figura 7. La tabla 5 reúne los valores de Tm-diana (en °C) obtenidos con las sondas y dianas descritas en este ejemplo. El aumento de la Tm-diana con respecto a una Tm-diana de referencia indica la formación de interacciones suplementarias entre la diana y su sonda. En este ejemplo, las Tm-diana de referencia corresponden a las Tm-diana medidas entre la sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13) y la diana Bioa2I (SEC ID N° 28) y a la medida entre la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1) y la diana Bio2al (SEC ID N° 28). Éstas son, respectivamente, igual a 57,3°C y 56,4°C.

Tabla 5: Presentación de los valores de Tm-diana obtenidos con las diferentes sondas

		Sondas	
		CpinfB (SEC ID N° 13)	Opa6d (SEC ID N° 1)
Secuencias diana	Bioa2I (SEC ID N° 28)	57,3	56,4
	6Ba2I (SEC ID N° 29)	65	57,8
	10Pa2I (SEC ID N° 30)	57,2	57,2
	6Pa2I (SEC ID N° 31)	58,6	58,4
	1Ba2I (SEC ID N° 32)	58,8	56,5
	1Pa2I (SEC ID N° 33)	57	56,6
	2Ba2I (SEC ID N° 34)	60,6	56,5
	2Pa2I (SEC ID N° 35)	57,3	57,3

- 5 La sonda *molecular beacon* CpinfB (SEC ID N° 13), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con ellas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CpinfB, se observa un aumento de la Tm-diana de la sonda *molecular beacon*. Este aumento es proporcional al número de nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de tallo de la sonda *molecular beacon*, e indica que hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda CPinfB y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes a la secuencia de hibridación con la diana.
- 10 Cuando la sonda de acuerdo con la invención Opa6d (SEC ID N° 1) (sonda de tipo alfa) está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con ellas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opa6d, se observa que los valores de Tm-diana de la sonda de acuerdo con la invención permanecen estables, sea cual sea el número de estos nucleótidos complementarios. Esto indica que no hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes a la secuencia de hibridación con la diana.

### Conclusión:

- 20 La sonda de acuerdo con la invención Opa6d es más específica que la sonda *molecular beacon* CPinfB ya que no hay interacciones suplementarias entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda y la secuencia de la diana ni siquiera aunque estos nucleótidos sean complementarios entre sí. La única parte de la sonda de acuerdo con la invención que hibrida con el ácido nucleico diana correspondiente a la secuencia de reconocimiento molecular de la sonda Opa6d. El diseño de esta sonda disminuye fuertemente las posibilidades de hibridación no específica de la sonda de acuerdo con la invención con secuencias próximas a la secuencia de la diana.

### Ejemplo 10: Estudio de la hibridación de las sondas específicas de acuerdo con la invención de tipo alfa en 5' del modelo del VIH con su secuencia diana.

#### Objetivos:

- 30 El objetivo perseguido en este ejemplo es el mismo que el ya descrito en el ejemplo 9 en un modelo de diana diferente.

#### Diseño experimental:

Las sondas utilizadas son las siguientes:

Sonda HOa8 (SEC ID N° 2):

5'- accctatctc(dT-F AM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG -3' Da

- 35 *Molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21):

5' -(FAM)CTATCCCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG- 3' Da

Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o a las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo *alfa*.

5 Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

Diana BioH (SEC ID N° 36):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATAGTTTAAAC

Diana 5BH (SEC ID N° 37):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATAGTTTAAAC

10 Diana 11PH (SEC ID N° 38):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGAGATAGGGT

Diana 5PH (SEC ID N° 39):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGAGATTTAAAC

Diana 1BH (SEC ID N° 40):

15 TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATAGTTTAAAC

Diana 1PH (SEC ID N° 41):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGACTCTTTAAAC

Diana 2BH (SEC ID N° 42):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATCTTTAAAC

20 Diana 2PH (SEC ID N° 43):

TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGTCTTTAAAC

La secuencia subrayada con línea de puntos corresponde a la parte hibridable con la secuencia de reconocimiento de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21) o de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2).

25 La secuencia diana BioH (SEC ID N° 36) corresponde a un fragmento de la secuencia diana biológica del virus VIH. Ésta puede contener un nucleótido complementario de una secuencia de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o de una de las secuencias de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

30 La secuencia diana 5BH (SEC ID N° 37) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), cinco nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos cinco nucleótidos, subrayados con trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

35 La secuencia diana 11PH (SEC ID N° 38) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), once nucleótidos en 3' de la secuencia resaltada con línea de puntos. Estos once nucleótidos, subrayados con trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2).

La secuencia diana 5PH (SEC ID N° 39) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), cinco nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos cinco nucleótidos, subrayados con trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2).

40 La secuencia diana 1BH (SEC ID N° 40) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), un nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con trazo doble, es complementario de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

La secuencia diana 1PH (SEC ID N° 41) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), un



nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con trazo doble, es complementario de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2).

5 La secuencia diana 2BH (SEC ID N° 42) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), dos nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos nucleótidos, subrayados con trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

10 La secuencia diana 2PH (SEC ID N° 43) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), dos nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos dos nucleótidos, subrayados con trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2).

Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- Sonda a concentración 0,1 micromolar,
- Secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

15 El volumen final es de 20 µl.

Se realizan controles negativos con agua ultrapura MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

20 Las soluciones se calientan a 68°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana" que corresponde al punto de inflexión de la curva de fluorescencia = f(temperatura). La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de esta curva.

### **Resultados:**

25 Los resultados se presentan en la tabla 6 y en la figura 8. La tabla 6 a continuación reúne los valores de Tm-diana (en °C) obtenidos con las sondas y dianas descritas en este ejemplo. El aumento de la Tm-diana con respecto a una Tm-diana de referencia indica la formación de interacciones suplementarias entre la diana y su sonda. En este ejemplo, las Tm-diana de referencia corresponden a las Tm-diana medidas entre la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21) y la diana BioH (SEC ID N° 36) y la medida entre la sonda de acuerdo con la invención Hoas (SEC ID N° 2) y la diana BioH (SEC ID N° 36). Éstas son respectivamente igual a 60,6°C y 60,2°C.

30

Tabla 6: Presentación de los valores de Tm-diana obtenidos con las diferentes sondas.

		Sondas	
		HIV-1A (SEC ID N° 21)	HOa8 (SEC ID N° 2)
<b>Secuencias diana</b>	<b>BioH</b> (SEC ID N° 36)	60,6	60,2
	<b>5BH</b> (SEC ID N° 37)	68*	60,8
	<b>11PH</b> (SEC ID N° 38)	60,8	60,3
	<b>5PH (SEC ID N° 39)</b>	61,5	60,8
	<b>1BH</b> (SEC ID N° 40)	61,4	NA
	<b>1PH</b> (SEC ID N° 41)	61,5	60,9
	<b>2BH</b> (SEC ID N° 42)	63	61,3
	<b>2PH</b> (SEC ID N° 43)	61,6	61,3

\*: El valor de Tm entre la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21) y la diana complementaria 5BH (SEC ID N° 37) era más alto que el valor máximo medible de 68°C. Para las necesidades del experimento, se ha indicado el valor máximo medible posible.

NA: No Aplicable. El valor de Tm entre la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2) y la diana complementaria 1BH (SEC ID N° 40) no se ha podido medir ya que el perfil no corresponde al patrón medible con nuestro método. Este valor se determinó a partir de una lectura empírica del gráfico y es igual a 60°C.

- 5 La sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con ellas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de “tallo” de la sonda *molecular beacon* HIV-1A, se observa un aumento de la Tm-diana de la sonda *molecular beacon*. Este aumento es proporcional al número de nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de “tallo”, e indica que hay emparejamiento de bases entre estos nucleótidos y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de hibridación con la diana.
- 10 Cuando la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 2) (de tipo *alfa*), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con estas secuencias y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda HOa8, la Tm-diana de la sonda de acuerdo con la invención de tipo *alfa* permanece estable, lo que indica que no hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de hibridación con la diana.
- 15

**Conclusión:**

- 20 La sonda de acuerdo con la invención HOa8 es más específica que la sonda *molecular beacon* HIV-1<sup>a</sup>, ya que no hay interacciones suplementarias entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda y la secuencia de la diana ni siquiera aunque estos nucleótidos sean complementarios entre sí. La única parte de la sonda de acuerdo con la invención que hibrida con el ácido nucleico diana correspondiente a la secuencia de reconocimiento molecular de la sonda HOa8. El diseño de esta sonda disminuye fuertemente las posibilidades de hibridación no específicas de la sonda de acuerdo con la invención con secuencias próximas a la secuencia de la diana.

25 **Ejemplo 11: Estudio de la hibridación específica de las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido en 3' del modelo del virus de la gripe B con su secuencia diana.**

**Objetivos:**

- El objetivo perseguido en este ejemplo es el mismo que el descrito en el ejemplo 9 pero con un diseño de sonda de acuerdo con la invención que es diferente.

30 **Diseño experimental:**

Las sondas utilizadas son las siguientes:

Sonda Opi6d (SEC ID N° 5):

5'- Da -GGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGA-3' (dT-F AM) 3' -cctctctg -5'

*Molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13):

5'- CGATCGGGAGAAGACGTCCAAAACTGGCAGACGATCG -3' Da

5 Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o a las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo invertido.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

Diana Bioil (SEC ID N° 44):

10 TTGCAGCTCTTCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

Diana 6Bil (SEC ID N° 45):

TTGCCGATCGTCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

Diana 10Pil (SEC ID N° 46):

CAGAAGAGGATCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

15 Diana 6Pil (SEC ID N° 47):

TTGCAGAGGATCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

Diana 1Bil (SEC ID N° 48):

TTGCAGCTCGTCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

Diana 1Pil (SEC ID N° 49):

20 TTGCAGCTCATCTGCCAGTTTTGGACGTCTTCTCCTTT

La secuencia subrayada con línea de puntos corresponde a la parte hibridable con la secuencia de reconocimiento de la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13) o de la sonda de acuerdo con la invención HOa8 (SEC ID N° 5).

25 La secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44) corresponde a un fragmento de la secuencia diana biológica del virus de la gripe B. Ésta puede contener un nucleótido complementario de una secuencia de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o de una secuencias de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

30 La secuencia diana 6Bil (SEC ID N° 45) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44), seis nucleótidos en 5' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos seis nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13).

La secuencia diana 10Pil (SEC ID N° 46) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44), diez nucleótidos en 5' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos diez nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (SEC ID N° 5).

35 La secuencia diana 6Pil (SEC ID N° 47) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44), seis nucleótidos en 5' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos seis nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (SEC ID N° 5).

40 La secuencia diana 1Bil (SEC ID N° 48) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44), un nucleótido en 5' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con un trazo doble, es complementario de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13).

45 La secuencia diana 1Pil (SEC ID N° 49) contiene, con respecto a la secuencia diana Bioil (SEC ID N° 44), un nucleótido en 5' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con un trazo doble, es complementario de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (SEC ID N° 5).

Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- Sonda a concentración 0,1 micromolar,
- Secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

5 El volumen final es de 20 µl.

Se realizan controles negativos con agua ultrapura de tipo MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

10 Las soluciones se calientan a 68°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B. V, Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana" que corresponde al punto de inflexión de la curva. La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de la curva.

**Resultados:**

15 Los resultados se presentan en la tabla 7 y en la figura 9. La tabla 7 reúne los valores de Tm-diana (en °C) obtenidos con las sondas y dianas descritas en este ejemplo. El aumento de la Tm-diana con respecto a una Tm-diana de referencia indica la formación de interacciones suplementarias entre la diana y su sonda. En este ejemplo, las Tm-diana de referencia corresponden a las Tm-diana medidas entre la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13) y la diana Bioil (SEC ID N° 44) y a la medida entre la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (SEC ID N° 5) y la diana Bioil (SEC ID N° 44). Éstas son respectivamente igual a 62°C y 62,9°C.

20 Tabla 7: Presentación de los valores de Tm-diana obtenidos con las diferentes sondas.

		Sondas	
		CP2infB (SEC ID N° 13)	Opi6d (SEC ID N° 5)
<b>Secuencias diana</b>	<b>Bioil</b> (SEC ID N° 44)	62	62,9
	<b>6Bil</b> (SEC ID N° 45)	68*	64,5
	<b>10Pil</b> (SEC ID N° 46)	62,8	64,4
	<b>6Pil</b> (SEC ID N° 47)	62,4	63,4
	<b>1Bil</b> (SEC ID N° 48)	64,7	63,9
	<b>1Pil</b> (SEC ID N° 49)	61,9	62,7

\*: El valor de Tm entre la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13) y la diana complementaria 6Bil (SEC ID N° 45) era más alto que el valor máximo medible de 68°C. Para las necesidades del experimento, se ha indicado el valor máximo medible posible.

25 La sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con estas secuencias diana sintéticas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon* CP2infB (SEC ID N° 13), se observa un aumento proporcional del valor de la Tm-diana de la sonda *molecular beacon* con respecto al número de nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallo". Esto indica que hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de una de las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda CP2infB (SEC ID N° 13) y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de la diana.

30 La sonda de acuerdo con la invención Opi6d (de tipo invertido) (SEC ID N° 5), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con estas secuencias diana sintéticas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención Opi6d (SEC ID N° 5), la Tm-diana de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido permanece estable, lo que indica que no hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de la diana.

**Conclusión**

5 La sonda de acuerdo con la invención Opi6d es más específica que la sonda *molecular beacon* CPinfB, ya que no hay interacciones suplementarias entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda y la secuencia de la diana ni siquiera aunque estos nucleótidos sean complementarios entre sí. La única parte de la sonda de acuerdo con la invención que hibrida con el ácido nucleico diana correspondiente a la secuencia de reconocimiento molecular de la sonda Opi6d. El diseño de esta sonda disminuye fuertemente las posibilidades de hibridación no específicas de la sonda de acuerdo con la invención con secuencias próximas a la secuencia de la diana.

10 **Ejemplo 12: Estudio de la hibridación de las sondas de acuerdo con la invención de tipo invertido en 5' del modelo de VIH con su secuencia diana.**

**Objetivos:**

El objetivo perseguido en este ejemplo es el mismo que el descrito en el ejemplo 9 pero con un diseño de sonda de acuerdo con la invención y un modelo de diana que son diferentes.

**Diseño experimental:**

15 Las sondas utilizadas son las siguientes:

Sonda HOi8 (SEC ID N° 50):

3'- **accctatctc**-5'-5'-(dT-FAM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG -3' Da

*Molecular beacon* de referencia HIV-1A (SEC ID N° 21):

5'- (FAM)-CTATCCCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG -3' Da

20 Los segmentos subrayados corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o a las cadenas de la parte de "tallo" de la sonda *molecular beacon*.

Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo *invertido*.

Las secuencias diana sintéticas utilizadas son las siguientes:

Diana BioH (SEC ID N° 36):

25 5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAAC -3'

Diana 5BH (SEC ID N° 37):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATAGTTTAAC -3'

Diana 11PH (SEC ID N° 38):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGATAGGGT -3'

30 Diana 5PH (SEC ID N° 39):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGAGATTTTAAC -3'

Diana 1BH (SEC ID N° 40):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGCTCTTTTAAC -3'

Diana 1PH (SEC ID N° 41):

35 5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGACTCTTTTAAC -3'

Diana 2BH (SEC ID N° 42):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGGATCTTTTAAC -3'

Diana 2PH (SEC ID N° 43):

5'- TTTCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGAGTCTTTTAAC -3'

40 La secuencia subrayada con línea de puntos corresponde a la parte hibridable con la secuencia de reconocimiento de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21) o de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N°

50).

La secuencia diana BioH (SEC ID N° 36) corresponde a un fragmento de la secuencia diana biológica del virus VIH. Ésta puede contener un nucleótido complementario de una secuencia de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o de una de las secuencias de las cadenas de la parte de "tallos" de la sonda *molecular beacon*.

5 La secuencia diana 5BH (SEC ID N° 37) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), cinco nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos cinco nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallos" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

10 La secuencia diana 11PH (SEC ID N° 38) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), once nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos once nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N° 50).

La secuencia diana 5PH (SEC ID N° 39) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), cinco nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos.

15 Estos cinco nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N° 50).

20 La secuencia diana 1BH (SEC ID N° 40) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), un nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido, subrayado con un trazo doble, es complementario de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallos" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

La secuencia diana 1PH (SEC ID N° 41) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), un nucleótido en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Este nucleótido subrayado con un trazo doble, es complementario de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N° 50).

25 La secuencia diana 2BH (SEC ID N° 42) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), dos nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos dos nucleótidos, subrayados con un trazo doble, son complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de "tallos" de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21).

30 La secuencia diana 2PH (SEC ID N° 43) contiene, con respecto a la secuencia diana BioH (SEC ID N° 36), dos nucleótidos en 3' de la secuencia subrayada con línea de puntos. Estos dos nucleótidos, subrayados con un trazo doble son complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N° 50).

Las sondas se introducen en una solución que contiene:

- Diluyente basic kit (bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos, ref. 70352),
- Sonda a concentración 0,1 micromolar,
- 35 - Secuencia diana sintética a concentración 1,25 micromolar.

El volumen final es de 20 µl.

Se realizan controles negativos con agua ultrapura de tipo MilliQ en lugar de la secuencia diana. Esto permite observar el comportamiento de la sonda en solitario.

40 Las soluciones se calientan a 68°C en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos) y se dejan enfriar durante 5 horas. La fluorescencia de cada solución se mide a 520 nm durante toda la refrigeración. La estabilidad térmica de la doble hélice sonda/diana viene dada por el valor de "Tm-diana" que corresponde al punto de inflexión de la curva. La Tm-diana se calcula como el mínimo de la primera derivada de la curva.

### **Resultados:**

45 Los resultados se presentan en la tabla 8 y la figura 10. La tabla 8 reúne los valores de Tm-diana (en °C) obtenidos con las sondas y dianas descritas en este ejemplo. El aumento de la Tm-diana con respecto a una Tm-diana de referencia indica la formación de interacciones suplementarias entre la diana y su sonda. En este ejemplo, las Tm-diana de referencia corresponden a las Tm-diana medidas entre la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21) y la diana BioH (SEC ID N° 36) y a la medida entre la sonda de acuerdo con HOi8 (SEC ID N° 50) y la diana BioH (SEC ID N° 36). Éstas son respectivamente iguales a 60,6°C y 61,1°C.

Tabla 8: Presentación de los valores de Tm-diana obtenidos con las diferentes sondas.

		Sondas	
		HIV-1A (SEC ID N° 21)	HOi8 (SEC ID N° 50)
<b>Secuencias diana</b>	<b>BioH</b> (SEC ID N° 36)	60,6	61,1
	<b>5BH</b> (SEC ID N° 37)	68*	60,7
	<b>11PH</b> (SEC ID N° 38)	60,8	61,3
	<b>5PH</b> (SEC ID N° 39)	61,5	62,2
	<b>1BH</b> (SEC ID N° 40)	61,4	60,6
	<b>1PH</b> (SEC ID N° 41)	61,5	60,9
	<b>2BH</b> (SEC ID N° 42)	63	62,3
	<b>2PH</b> (SEC ID N° 43)	61,6	62,3

\*: El valor de Tm entre la sonda *molecular beacon* HIV-1A y la diana complementaria 5BH era más alto que el valor máximo medible de 68°C. Para las necesidades del experimento, se ha indicado el valor máximo medible posible.

5 La sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con estas secuencias diana sintéticas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de “tallo” de la sonda *molecular beacon* HIV-1A (SEC ID N° 21), se observa que la Tm-diana de la sonda *molecular beacon* aumenta de forma proporcional con respecto al número de nucleótidos complementarios de la secuencia de una de las cadenas de la parte de “tallo”. Esto indica que hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de la secuencia de una de las cadenas de la parte de “tallo” de la sonda HIV-1A (SEC ID N° 21) y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de la diana.

10 La sonda de acuerdo con la invención HOi8 (de tipo invertido) (SEC ID N° 50), cuando está en solución en presencia de diferentes secuencias diana sintéticas, hibrida con estas secuencias diana sintéticas y produce una señal de fluorescencia medible. Cuando la diana sintética contiene nucleótidos complementarios de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención HOi8 (SEC ID N° 50), la Tm-diana de la sonda de acuerdo con la invención de tipo invertido permanece estable, lo que indica que no hay emparejamiento de bases entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda de acuerdo con la invención y los nucleótidos complementarios que se encuentran adyacentes en la secuencia de la diana.

### Conclusión:

15 La sonda de acuerdo con la invención Hoi8 es más específica que la sonda *molecular beacon* HIV-1A ya que no hay interacciones suplementarias entre los nucleótidos de una de las secuencias de cierre de la sonda y la secuencia de la diana ni siquiera aunque estos nucleótidos sean complementarios entre sí. La única parte de la sonda de acuerdo con la invención que hibrida con el ácido nucleico diana correspondiente a la secuencia de reconocimiento molecular de la sonda Hoi8. El diseño de esta sonda disminuye fuertemente las posibilidades de hibridación no específicas de la sonda de acuerdo con la invención con secuencias próximas a la secuencia de la diana.

### Conclusión general:

20 Estos ejemplos demuestran que sea cual sea el diseño de la sonda de acuerdo con la invención, esta última presenta una especificidad de hibridación superior a la de una sonda *molecular beacon*. La naturaleza de los nucleótidos (nucleótido alfa o nucleótido invertido) así como su posición con respecto al segundo fragmento de la sonda de acuerdo con la invención (posición en 3' o posición en 5') no influye en la calidad del diseño ni en la especificidad de hibridación de la sonda de acuerdo con la invención por su ácido nucleico diana.

### Ejemplo 13: Estudio de la disminución de la señal no específica de origen enzimático mediante la utilización de las sondas de acuerdo con la invención.

#### Objetivos:

30 El objetivo de este ejemplo es estudiar la sensibilidad de las sondas de acuerdo con la invención con respecto a los fenómenos de apertura prematura no deseados de dichas sondas.

**Diseño experimental:**

Las sondas se incuban junto con la enzima T7 ARN polimerasa utilizada en NASBA en la mezcla de reacción, cuya composición se describe a continuación, durante cuatro horas a 41°C, en el lector de fluorescencia (EasyQ reader, bioMérieux B. V., Boxtel, Países Bajos). La composición de la mezcla de reacción es:

- 5
- 10 µl de “*reagent mix*”, preparado según las instrucciones del proveedor a partir de un reactivo esfera NucliSens EQ Basic Kit (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085110) diluido en 64 microlitros de diluyente reactivo esfera Basic Kit (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 70352),
  - 3,76 microlitros de sorbitol (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085192),
  - 0,2 microlitros de enzima T7 ARN polimerasa a una concentración de 80 unidades por microlitro (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 72236),
  - 2 microlitros de sonda a una concentración inicial de 2 micromolar.
  - Cantidad suficiente de solución “*enzyme mix solution*” para un volumen final de 20 microlitros.
- 10

Se realiza una mezcla de reacción de referencia que contiene todos los componentes excepto la enzima, la cual se sustituye por un volumen equivalente de “*enzyme mix solution*”.

- 15 La solución “*enzyme mix solution*” se prepara realizando una mezcla de varias soluciones más, de la siguiente manera:

80 microlitros de tampón *RT storage buffer* (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085341),  
 114 microlitros de tampón *T7 storage buffer* (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085337),  
 20 microlitros de tampón *RH storage buffer* (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085339),  
 411 microlitros de solución *Premix solution* (bioMérieux B.V., Boxtel, NL, nº de art. 60085335),  
 625 microlitros de agua ultrapura de tipo MilliQ.

La señal de fluorescencia se registra durante cuatro horas a 41°C, a la longitud de onda de emisión de la fluoresceína.

Las sondas utilizadas son las siguientes:

- 25 Sonda Opi6d (SEC ID Nº 5):

5'- Da GGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGA- 3'(dT-FAM) 3-**cctctctg**-5'

Sonda Opa6d (SEC ID Nº 1):

5'-gaccgtctg(dT-FAM)GGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGAC- 3' Da

Sonda HOi8 (SEC ID Nº 50):

- 30 3'-**accctatctc**-5'-5'-(dT-FAM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG-3' Da

Sonda HOa8 (SEC ID Nº 2):

5'- accctatctc(dT-FAM)CCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG -3' Da

*Molecular beacon* HIV-1A (SEC ID Nº 21):

5'- (FAM)-CTATCCCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG -3' Da

- 35 *Molecular beacon* CpinfB (SEC ID Nº 13):

5'- (FAM)-CGATCGGGAGAAGACGTCCAAAAACTCGATCG -3' Da

- 40 Las secuencias nucleotídicas subrayadas corresponden a las secuencias de cierre de las sondas de acuerdo con la invención o a las secuencias de las cadenas que forman la parte de “tallo” de la sonda *molecular beacon*. Los nucleótidos escritos en minúscula en las sondas corresponden a nucleótidos de tipo alfa. Los nucleótidos escritos en minúscula y en negrita en las sondas corresponden a nucleótidos invertidos.



**Resultados:**

- 5 La emisión de fluorescencia se mide durante la incubación de las diferentes sondas en presencia (figura 11a) o en ausencia (figura 11b) de enzima T7 ARN polimerasa. En ausencia de ácido nucleico diana y en ausencia de T7 ARN polimerasa (figura 11b), no se detecta ninguna señal de fluorescencia, ya sea para las sondas de acuerdo con la invención o para las sondas *molecular beacons*. Esto significa que en estas condiciones experimentales, el fluoróforo y el extintor están a una distancia próxima entre sí, permitiendo la “extinción” de la fluorescencia. Las sondas *molecular beacon* están, por lo tanto, en una configuración cerrada, es decir tienen una estructura secundaria en forma de horquilla para el pelo. Las sondas de acuerdo con la invención están en una conformación cerrada, conformación llamada circular.
- 10 En presencia de la T7 ARN polimerasa y en ausencia de cualquier ácido nucleico diana, la fluorescencia emitida por las sondas de acuerdo con la invención es la misma que la medida en ausencia de la T7 ARN polimerasa y en ausencia de cualquier ácido nucleico diana. En este caso también se observa una “extinción” de fluorescencia. Las sondas de acuerdo con la invención siguen estando en su conformación inicial, es decir en una conformación circular incluso en presencia de la enzima.
- 15 Por el contrario, cuando se añade la enzima T7 ARN polimerasa al medio de reacción que contiene las sondas *molecular beacon*, se observa un aumento de la señal de fluorescencia. Esto significa que la distancia entre el fluoróforo y el extintor ha aumentado. Un cambio de conformación de la sonda *molecular beacon* se realiza durante la adición de la T7 ARN polimerasa. Las sondas *molecular beacons* se abren. Éstas tienen una conformación lineal como si hubieran hibridado con su ácido nucleico diana.

**20 Conclusión:**

- 25 Los resultados muestran que las dos sondas *molecular beacons* analizadas, CPinfB y HIV-1A, producen un aumento de la señal durante su incubación en presencia de la enzima T7 ARN polimerasa, mientras que las sondas de acuerdo con la invención analizadas en las mismas condiciones no producen este mismo aumento de la señal. Este resultado se verifica para todas las sondas de acuerdo con la invención ensayadas, ya tengan una secuencia de cierre modificada en 3' o en 5', y contengan nucleótidos alfa o invertidos. Las sondas de acuerdo con la invención no son, por lo tanto, sensibles a los efectos de los contaminantes tales como T7 ARN polimerasa, por ejemplo. No hay apertura espontánea no deseada de las sondas de acuerdo con la invención, por lo tanto no hay emisión de una señal no específica.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> bioMérieux  
 <120> Nueva sonda de detección  
 <130> O-PROBE  
 5 <150> FR0854549  
 <151> 04-07-2008  
 <160>50  
 <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 15 <220>  
 <223> Sonda
- <220>  
 <221> misc\_feature <222> (1)..(9)
- 20 <223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica
- <400> 1  
 gaccgtctgt ggagaagacg tccaaaaact ggcagac 37
- 25 <210> 2  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> Sonda
- <220>  
 <221> misc\_feature
- 35 <222> (1)..(10)

<223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica

<400> 2

accctatctc tccatcaatg aggaagctgc agaatgggat agag 44

5

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Diana

<400> 3

15 tttagttttt ggacgtcttc tcctt 26

<210> 4

<211> 38

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

25 <400> 4

tttactctat cccattctgc agcttctca ttgatttt 38

<210> 5

<211> 36

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

35

<220> <221> misc\_feature

<222> (1)..(27)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> (28). . (36)

<223> nucleótidos invertidos

<400> 5

10 ggagaagacg tccaaaaact ggcagatcct cttctg 36

<210> 6

<211> 45

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

20 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(34)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

25 <220>

<221> misc\_feature

<222> (35)..(45)

<223> nucleótidos invertidos

30 <400> 6

ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtggtagt tactc 45

<210> 7

<211> 47

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor y cebador

5 <400> 7

aattctaata cgactcacta taggggagct ctgcttagc actcca 47

<210> 8

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

15

<400> 8

gagaaatgca gatggtctca gcta 24

<210> 9

20 <211> 54

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador y promotor

<400> 9

aattctaata cgactcacta tagggtgcta tgcacttcc ccttggtct ctca 54

30 <210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 10

agtgggggga catcaagcag ccatgcaaa 29

<210> 11

10 <211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Sonda

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

20 <223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica

<400> 11

accctatcct atcaatgagg aagctgcaga atgggatagg 40

25 <210> 12

<211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

5 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(33)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

10 <220>

<221> misc\_feature

<222> (34)..(43)

<223> nucleótidos invertidos

15 <400> 12

ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata ggtgtagtt act 43

<210>13

<211>32

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

25

<400>13

cgatcgggag aagacgtcca aaaactcgat cg 32

<210> 14

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Sonda

<220>

10 <221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

<223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica

<400> 14

15 gagcgtagct ggagaagacg tcaaaaaact cgcacg 37

<210> 15

<211> 35

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

25 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(8)

<223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica



<400> 15

gagctagctg gagaagacgt ccaaaaactc gatcg 35

5 <210> 16

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Sonda

<220>

<221> misc\_feature

15 <222> (1)..(8)

<223> nucleótidos invertidos

<220>

<221> misc\_feature

20 <222> (9)..(35)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

<400> 16

gagctagctg gagaagacgt ccaaaaactc gatcg 35

25

<210> 17

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

5

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(7)

<223> nucleótidos invertidos

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(35)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

15

<400>17

gctagcctgg agaagacgtc caaaaactcg atcgg 35

<210> 18

20

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> Diana

<400> 18

ttagttttt ggaggtcttc tcctt 26

<210> 19

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

10 <400>19

ttagttttt ggaagtcttc tccttt 26

<210> 20

<211> 26

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

20

<400> 20

ttagttttt ggatgtcttc tccttt 26

<210> 21

25 <211>36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 21

5 ctatcccatc aatgaggaag ctgcagaatg ggatag 36

<210> 22

<211>39

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

15 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(10)

<223> ácido nucleico con configuración alfa anomérica

20 <400> 22

ttaccctatc ttcaatgagg aagctgcaga atgggatag 39

<210> 23

<211> 44

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (1)..(33)

<223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (34)..(44)

<223> nucleótidos invertidos

<400> 23

ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata ggtggtagtt actc 44

15

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Diana

<400> 24

25 ttcattctg cagctcctc att 24

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Diana

<400> 25

tttcattctg caggttcctc attt 24

10 <210> 26

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Diana

<400> 26

tttcattctg cagattcctc attt 24

20

<210> 27

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Diana

ES 2 378 224 T3

<400> 27

tffcattctg cagtttctc att 24

<210> 28

5 <211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Diana

<400> 28

ttagttttt ggacgtctc tcctttcca att 33

15 <210> 29

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Diana

<400> 29

ttagttttt ggacgtctc tcccgatcga att 33

25

<210> 30

<211>33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

5

<400> 30

tttagttttt ggacgtcttc tccacagacg gtc 33

<210> 31

10 <211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Diana

<400> 31

tttagttttt ggacgtcttc tccacagaca att 33

20 <210> 32

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Diana

<400> 32



ES 2 378 224 T3

ttagtttt ggacgtctc tcccttcca att 33

<210> 33

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

10

<400> 33

ttagtttt ggacgtctc tccattcca att 33

<210> 34

15 <211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Diana

<400> 34

ttagtttt ggacgtctc tccgtcca att 33

25 <210> 35

<211>33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

5 <400> 35

tttagttttt ggacgtcttc tccactcca att 33

<210> 36

<211> 39

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

15

<400> 36

tttcattctg cagcttcctc attgatggtc tctttaac 39

<210> 37

20 <211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Diana

<400> 37

tttcattctg cagcttcctc attgatggga tagttaac 39

<210> 38

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

10 <400> 38

tffcattctg cagcttcctc attgatggag agataggt 39

<210> 39

<211> 39

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

20

<400> 39

tffcattctg cagcttcctc attgatggag agattaac 39

<210> 40

25 <211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

<400> 40

5 ttcattctg cagctcctc attgatggc tctttaac 39

<210> 41

<211> 39

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

15 <400> 41

ttcattctg cagctcctc attgatggac tctttaac 39

<210> 42

<211> 39

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

25

<400> 42

ttcattctg cagctcctc attgatggga tctttaac 39

<210> 43

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Diana

<400> 43

10 ttcattctg cagcttcctc attgatggag tctttaac 39

<210> 44

<211> 39

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

20 <400> 44

ttgcagctct tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

<210> 45

<211> 39

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Diana

<400> 45

ttgccgatcg tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

5

<210> 46

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Diana

<400> 46

15 cagaagagga tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

<210> 47

<211> 39

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Diana

25 <400> 47

ttgcagagga tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

<210> 48

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Diana

<400> 48

ttgcagctcg tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

10

<210> 49

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Diana

<400> 49

20 ttgcagctca tctgccagtt ttggacgtc ttctcctt 39

<210> 50

<211> 44

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(10)

5 <223> nucleótidos invertidos

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(44)

10 <223> nucleótidos naturales que portan enlaces fosfodiéster (5'-3')

<400> 50

accctatctc tccatcaatg aggaagctgc agaatgggat agag 44

15



**REIVINDICACIONES**

1. Sonda de detección de un ácido nucleico diana, constituida por una cadena nucleotídica marcada que comprende tres fragmentos:
  - un primer fragmento que presenta una primera secuencia de cierre,
  - 5 - un segundo fragmento del que todo o parte presenta una secuencia de reconocimiento para el reconocimiento molecular del ácido nucleico diana,
  - un tercer fragmento que presenta una segunda secuencia de cierre, y
  - al menos dos marcadores, estando uno de los extremos de la cadena de dicha sonda de detección libre de cualquier marcador,
- 10 en la que, cuando las dos secuencias de cierre hibridan juntas, la sonda de detección tiene una forma completamente circular, manteniendo de este modo dichas secuencias de cierre a dicha sonda en una conformación no detectable en ausencia de dicho ácido nucleico.
2. Sonda de detección de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** un primer marcador es portado por un nucleótido del primer fragmento y un segundo marcador es portado por un nucleótido del segundo o del tercer fragmento, siendo los dos nucleótidos contiguos cuando las dos secuencias de cierre están hibridadas.
- 15 3. Sonda de detección, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada porque** todo o parte de las dos secuencias de cierre hibridan de forma paralela.
4. Sonda de detección, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** toda o parte de una de las secuencias de cierre es una secuencia constituida por nucleótidos *alfa*.
- 20 5. Sonda de detección, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada porque** todo o parte de las dos secuencias de cierre hibridan de forma antiparalela.
6. Sonda de detección, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, **caracterizada porque** una de las dos secuencias de cierre está unida a la secuencia de reconocimiento mediante un enlace invertido 5'-5' o 3'-3'.
- 25 7. Sonda de detección, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** al menos un marcador es un fluoróforo y al menos otro marcador es un extintor de fluorescencia.
8. Sonda, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** toda o parte de la primera o de la segunda secuencia de cierre puede hibridar con la secuencia diana.
- 30 9. Sonda, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** una secuencia nucleotídica está unida al extremo de una de las secuencias de cierre.
10. Método para detectar una secuencia diana susceptible de estar presente en una muestra que comprende las siguientes etapas:
  - poner en contacto a la muestra con una sonda de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
  - 35 - detectar la formación de un híbrido entre la sonda de detección y la secuencia diana, lo que indica la presencia de dicha secuencia diana en dicha muestra.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** la detección se realiza conjuntamente con una reacción de amplificación de la secuencia diana.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** la detección se realiza después de una reacción de amplificación de la secuencia diana.
- 40 13. Kit para detectar una secuencia diana que comprende al menos una sonda de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

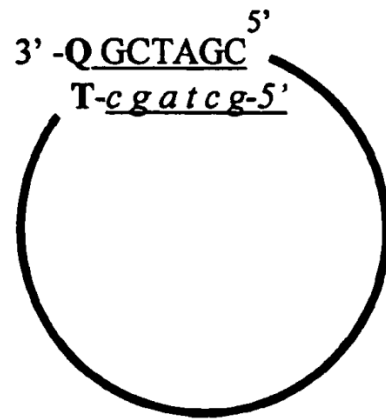


Figura 1

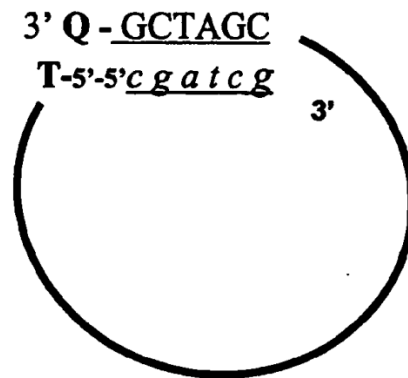


Figura 2

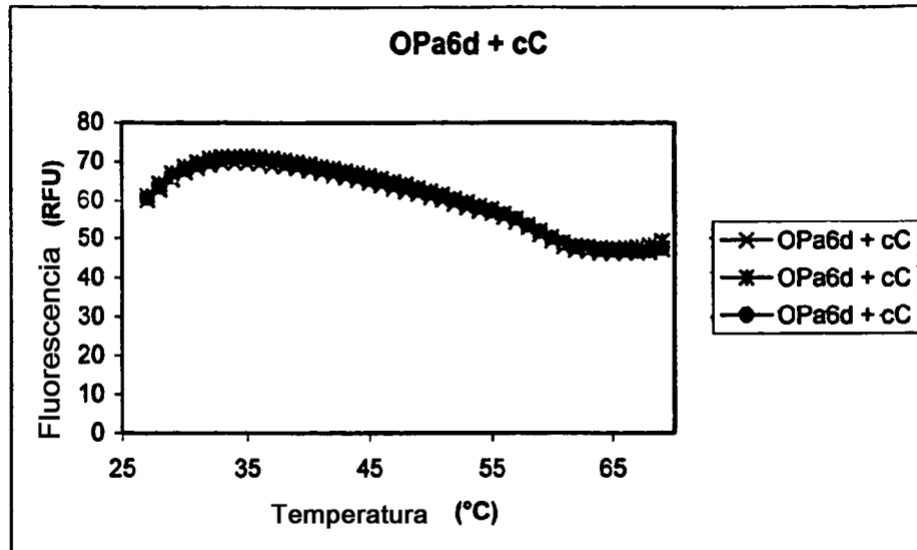


Figura 3a

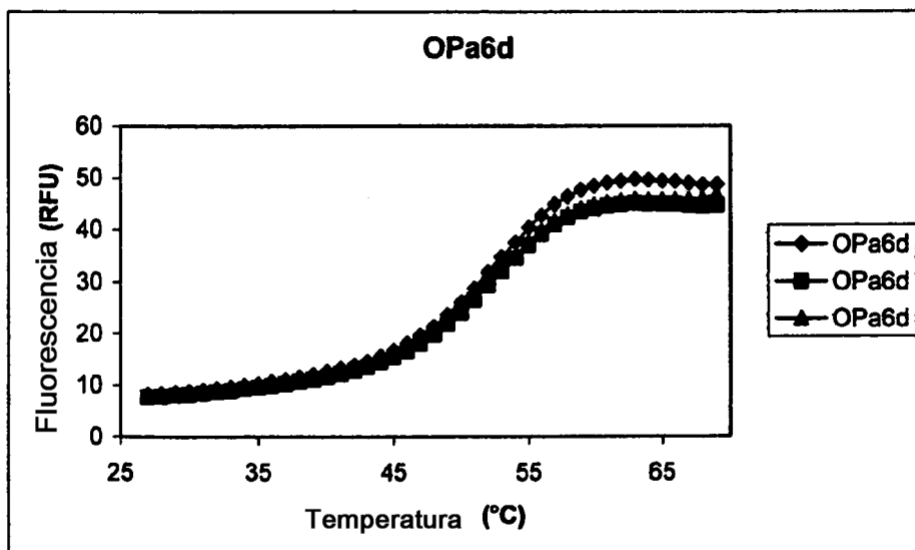


Figura 3b

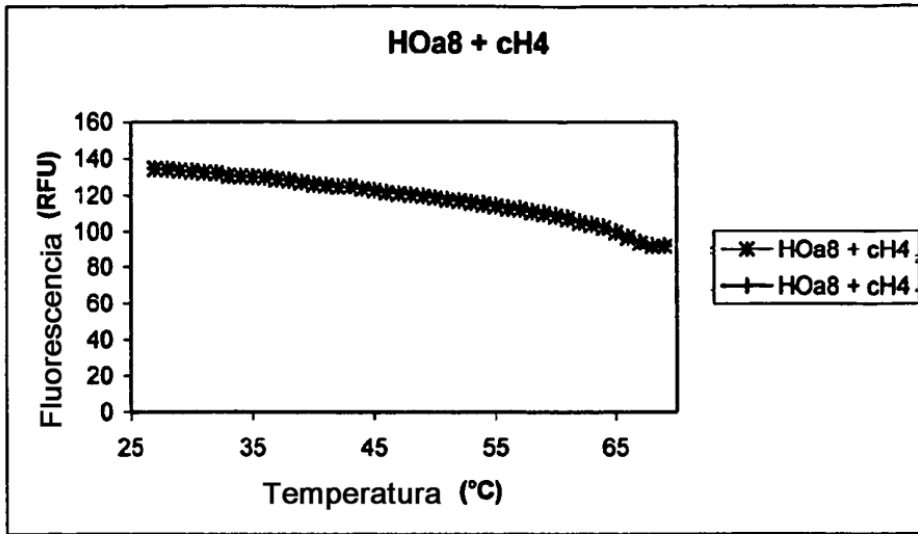


Figura 4a

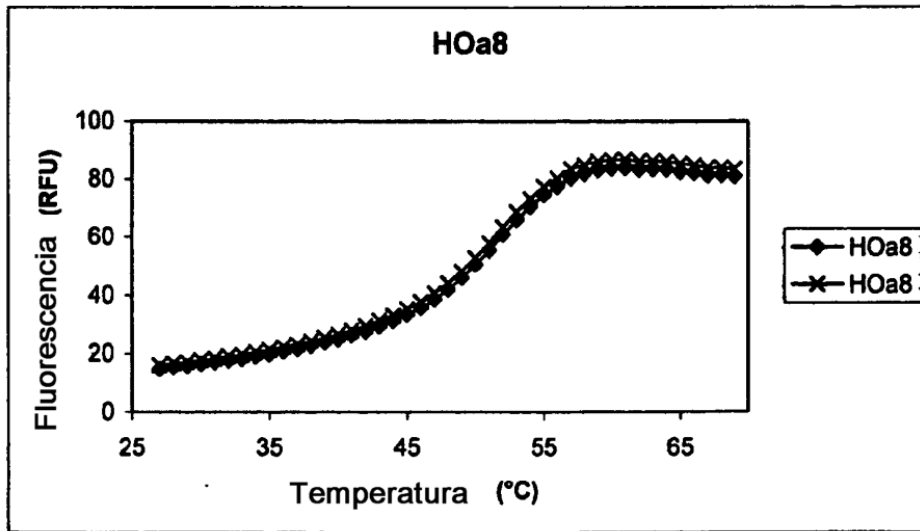


Figura 4b

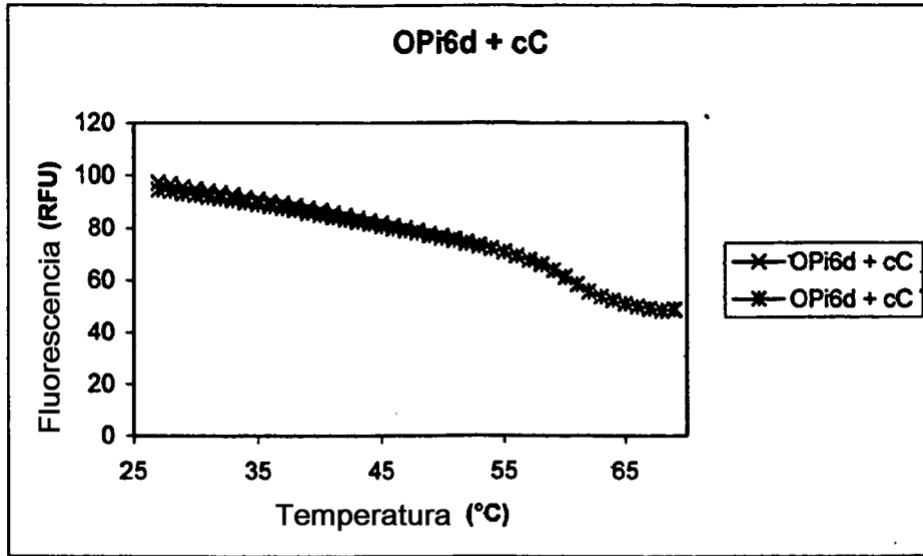


Figura 5a

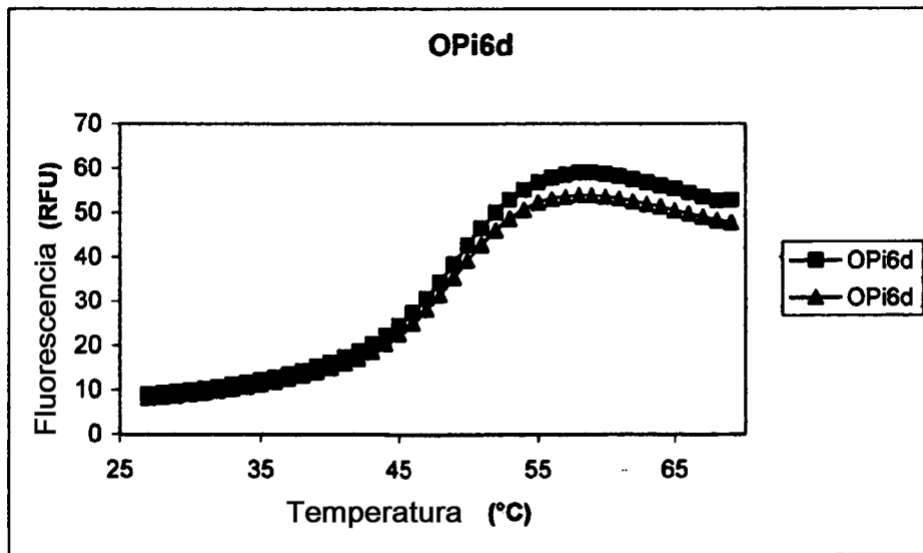


Figura 5b

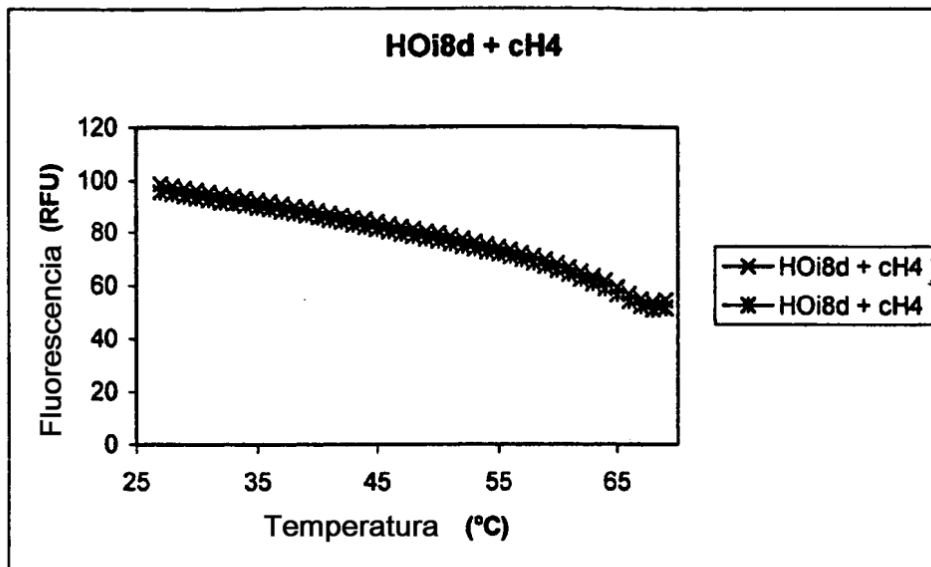


Figura 6a

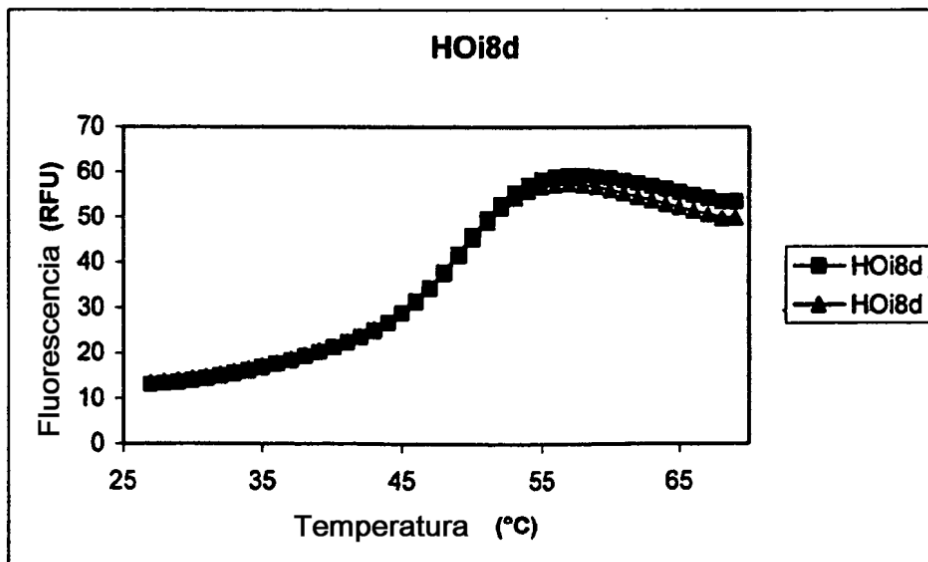


Figura 6b

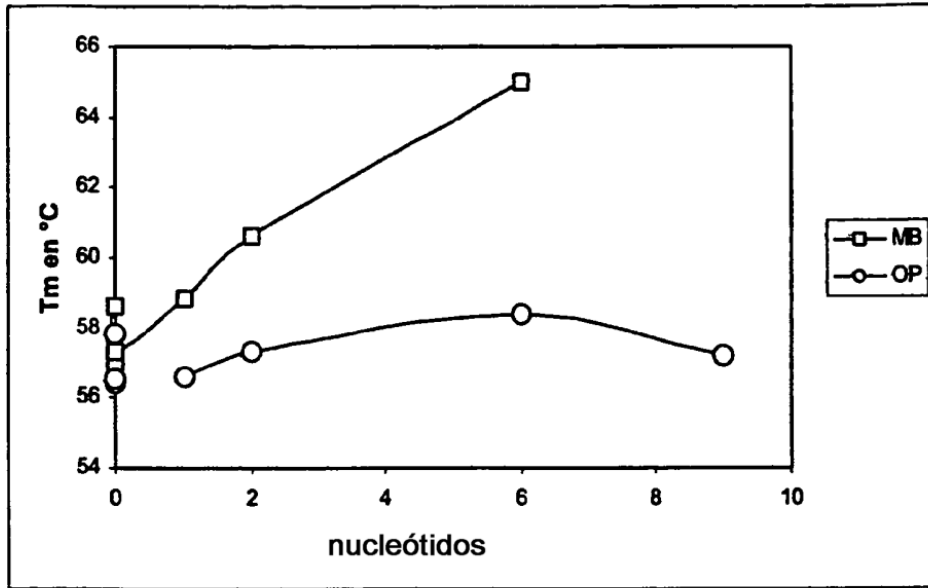


Figura 7

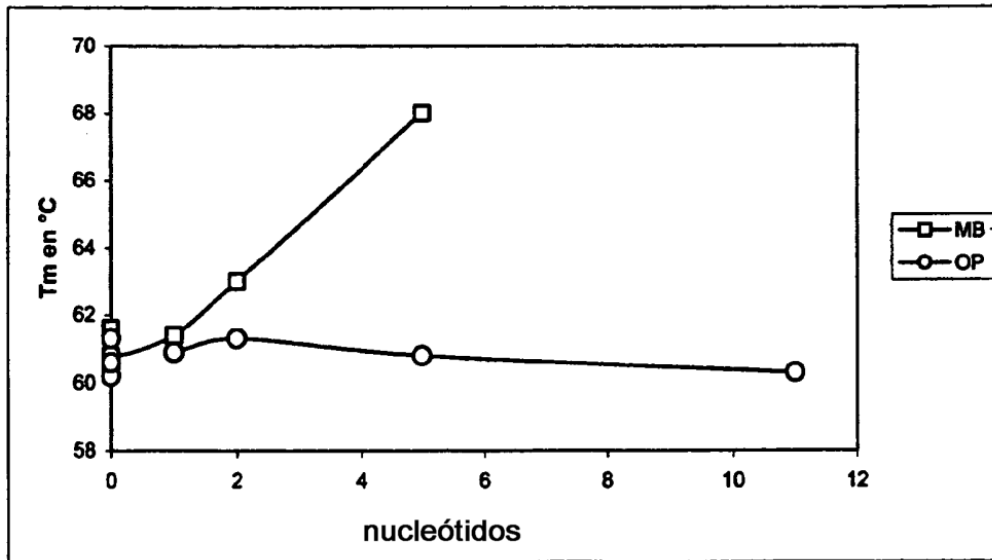


Figura 8

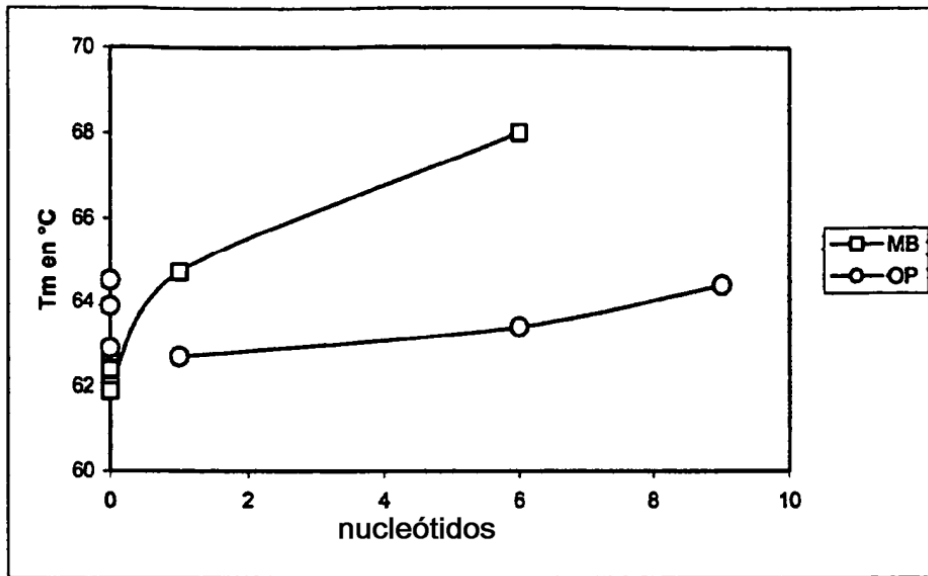


Figura 9

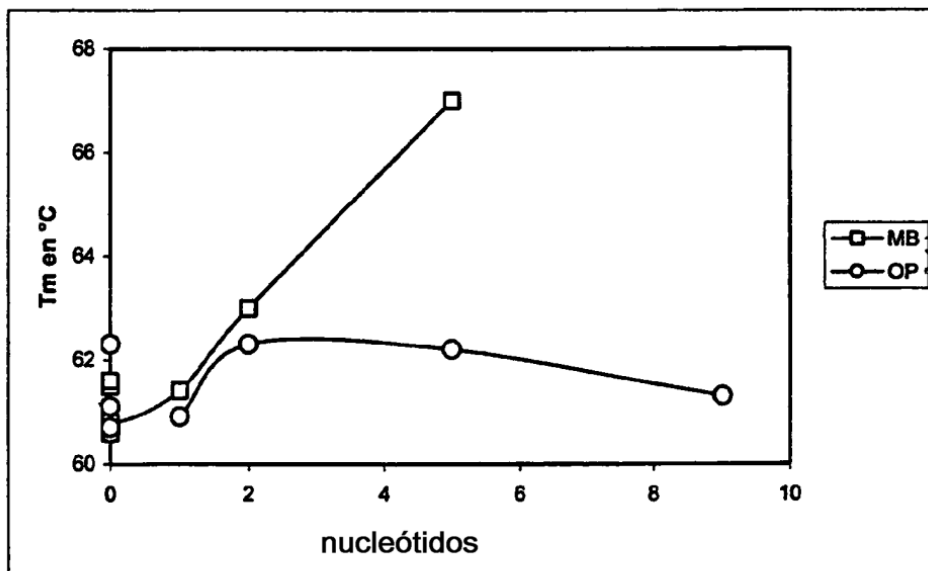


Figura 10



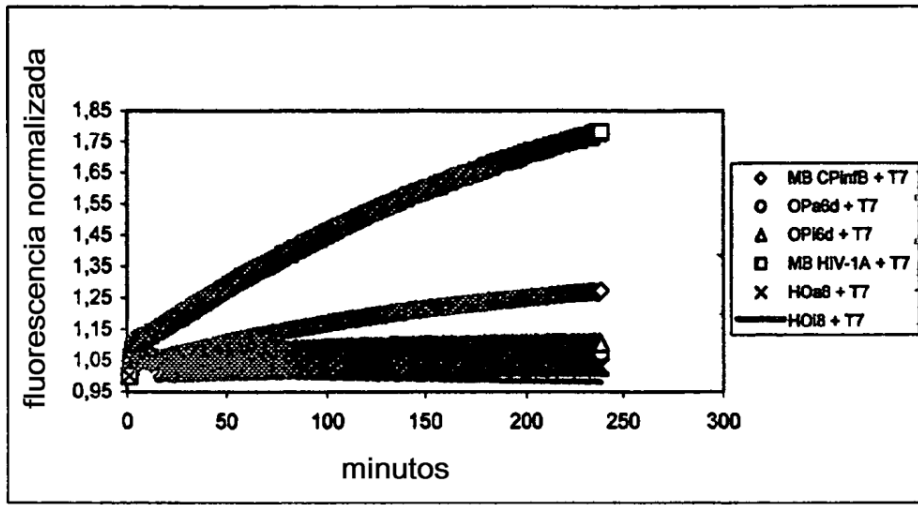


Figura 11a

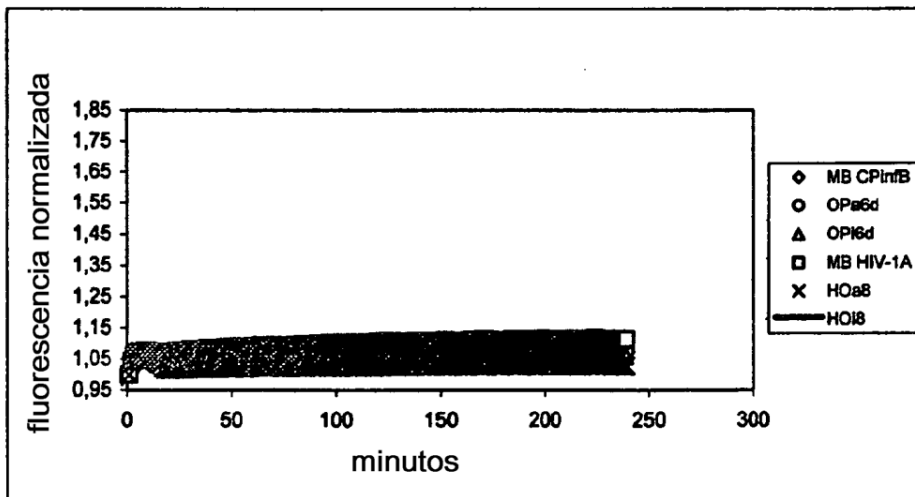


Figura 11b

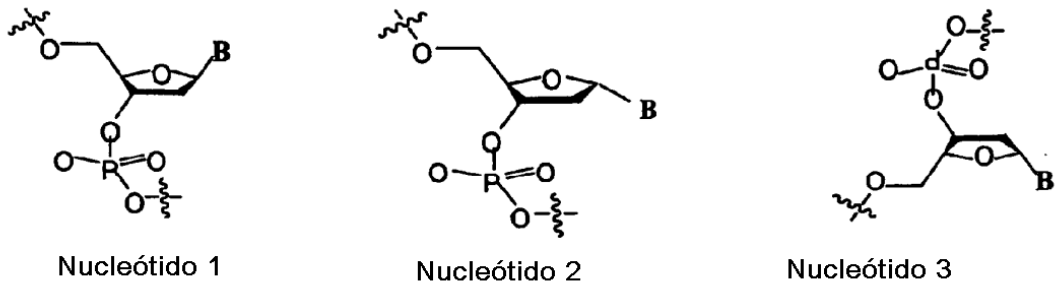


Figura 12a

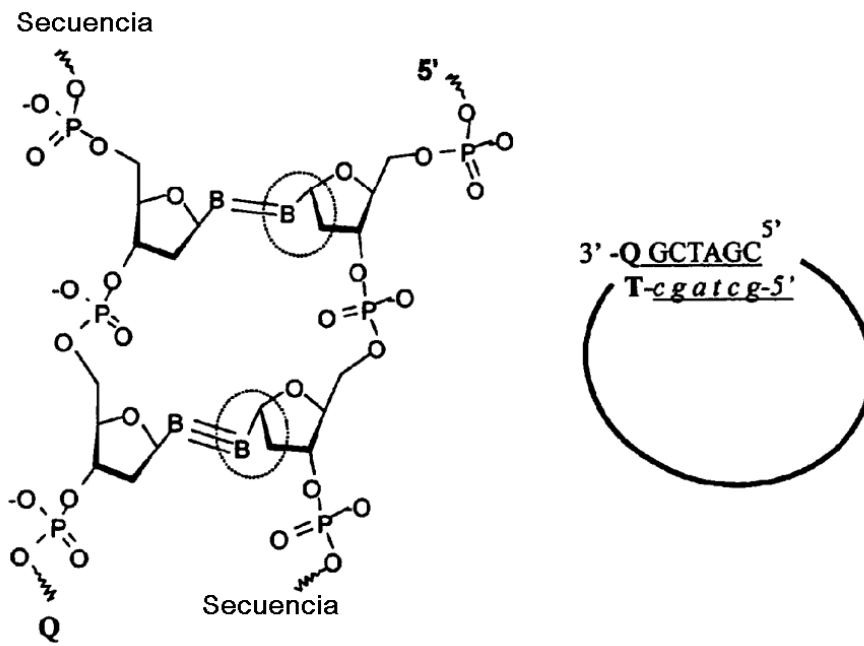


Figura 12b

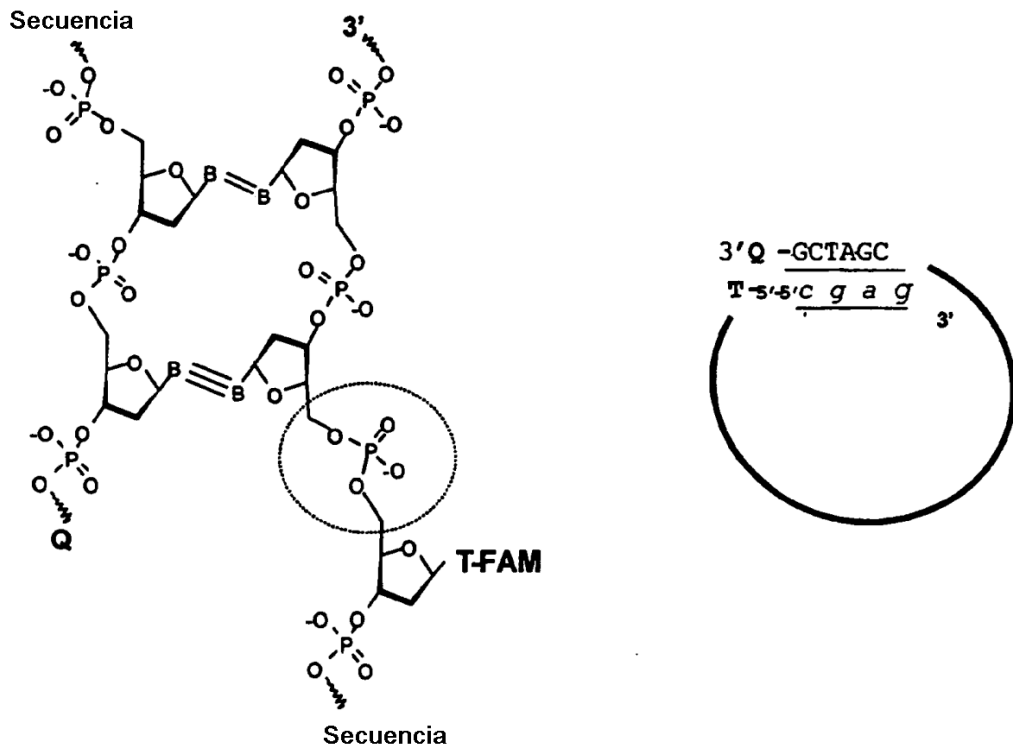


Figura 12c