

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 485**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04820755 .9**

96 Fecha de presentación: **15.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1709200**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Sonda de ácido nucleico lineal de doble hebra y usos de la misma**

30 Prioridad:  
**03.12.2003 US 526480 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.07.2012**

73 Titular/es:  
**ABBOTT LABORATORIES**  
Dept. 377, Bldg AP6A-1 100 Abbott Park Road  
Abbott Park, IL 60064-6008, US

72 Inventor/es:  
**ABRAVAYA, Klara;**  
**HACKETT, John R., Jr.;**  
**HUANG, Shihai;**  
**LUK, Ka-Cheung;**  
**SALITURO, John A. y**  
**MORRISON, Larry E.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 385 485 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

Sonda de Ácido Nucleico Lineal de Doble Hebra y Usos de la Misma.

5 **Campo de la Invención**

La invención se refiere generalmente al campo de la amplificación y detección de ácidos nucleicos. Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones y métodos para realizar la PCR y la hibridación con sondas utilizando una única mezcla de reactivos.

10

**Antecedentes**

Los análisis basados en ADN se utilizan rutinariamente en una amplia gama de escenarios, incluyendo la hematología clínica, la genética molecular, la microbiología y la inmunología. Muchas técnicas actuales cuentan con la amplificación mediante PCR de un polinucleótido de interés (en adelante "molécula diana") junto con varios tipos de técnicas de detección post-amplificación. Otros mecanismos de amplificación no basados en PCR son bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, análisis de ligación de oligonucleótidos (OLA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), y amplificación con desplazamiento de la hebra (SDA). Adicionalmente, estas técnicas son susceptibles de mezclado. Esto es, el producto de una reacción de amplificación se puede utilizar como la diana de otra reacción de amplificación, lo que permite una gran sensibilidad con una etapa adicional que tiende a aumentar la sensibilidad.

Un formato de amplificación preferido es conocido como análisis homogéneo en tiempo real. Un análisis en tiempo real es aquel que produce datos indicativos de la presencia o cantidad de una molécula diana durante el proceso de amplificación, en oposición al final del proceso de amplificación. Un análisis homogéneo es aquel en el que los reactivos de amplificación y detección se mezclan entre sí y se ponen en contacto simultáneamente con una muestra, que puede contener una molécula de ácido nucleico diana. De este modo, la capacidad para detectar y cuantificar dianas de ADN en sistemas homogéneos en tiempo real a medida de que la amplificación avanza se centra en análisis de un solo tubo en los cuales los procesos requeridos para la amplificación y la detección de la molécula diana tienen lugar en un formato de reacción en un único "tubo cerrado". Por ejemplo, las técnicas actuales que utilizan la amplificación mediante PCR y que tienen estas características son conocidas generalmente como técnicas de PCR en Tiempo Real. De un modo similar, las tecnologías no basadas en la PCR también están dentro del conocimiento práctico del experto normal en la técnica y son aptas para métodos de detección homogéneos.

En la mayor parte de las técnicas de amplificación y detección se utiliza una sonda para detectar un producto de amplificación. Varios sistemas de sondas conocidos en la técnica utilizan un fluoróforo y un extintor. Por ejemplo, las sondas baliza moleculares son sondas de ácidos oligonucleicos de hebra sencilla que pueden formar una estructura en horquilla en la cual un fluoróforo y un extintor están colocados normalmente en los extremos opuestos del oligonucleótido. En cualquier extremo de la sonda secuencias complementarias cortas permiten la formación de un tallo intramolecular, que permite que el fluoróforo y el extintor se acerquen suficientemente. La porción de bucle de la baliza molecular es complementaria a un ácido nucleico diana de interés. La unión de esta sonda a su ácido nucleico diana de interés forma un híbrido que mantiene el tallo alejado. Esto ocasiona un cambio de conformación que separa el fluoróforo y el extintor entre sí y conduce a una señal fluorescente más intensa. Las sondas baliza moleculares son, sin embargo, muy sensibles a una pequeña variación en la secuencia en la sonda diana (Tyagi S. y Kramer F.R., *Nature Biotechnology*, Vol. 14, páginas 303-308 (1996); Tyagi et al., *Nature Biotechnology*, Vol. 16, páginas 49-53(1998); Piatek et al., *Nature Biotechnology*, Vol.16, páginas 359-363 (1998); Marras S. et al., *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. Vol. 14, páginas 151-156 (1999); Täpp I. et al, *BioTechniques*, Vol 28, páginas 732-738 (2000)).

A diferencia de las sondas baliza moleculares, algunas sondas lineales de hebra sencilla que poseen también un extintor y un fluoróforo unidos a extremos opuestos de un oligonucleótido no forman una estructura en horquilla. En lugar de eso, esta clase de sondas de oligonucleótidos lineales en solución se comportan como una espiral al azar, sus dos extremos se aproximan entre sí ocasionalmente, dando como resultado un cambio medible en la transferencia de energía. Sin embargo, cuando la sonda se une a su diana, el híbrido sonda-diana mantiene alejados los dos extremos de la sonda, interrumpiendo la interacción entre los dos radicales terminales, y restaurando de este modo la señal fluorescente del fluoróforo. Además, las sondas lineales de hebra sencilla se pueden diseñar como "sondas TaqMan", que se unen a hebras de la diana durante la PCR y de este modo pueden ser escindidas enzimáticamente por la actividad exonucleasa 5'→ 3' de la ADN polimerasa Taq durante la fase de extensión del cebador del ciclo de la PCR dando como resultado un incremento en la fluorescencia en cada ciclo proporcional a la cantidad de producto específico generado. Se ha informado de que las sondas lineales de hebra sencilla largas adolecen de señales de "fondo" elevadas, mientras las más cortas son sensibles a emparejamientos erróneos de una sola base (Lee L.G. et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, páginas 3761-3766 (1993); Täpp I. et al. (más arriba); Patente de los Estados Unidos Núm. 6.258.569; Patente de los Estados Unidos Núm. 6.030.787).

Las sondas lineales de doble hebra también son conocidas en la técnica. Las sondas lineales de doble hebra tienen dos oligonucleótidos complementarios. Las sondas descritas en la técnica anterior tenían la misma longitud, donde

al menos uno de los oligonucleótidos actúa como sonda para una secuencia diana en una conformación de hebra sencilla. El extremo 5' de uno de los oligonucleótidos está marcado con un fluoróforo y el extremo 3' del otro oligonucleótido está marcado con un extintor, p. ej., un fluoróforo aceptor, o *vice versa*. Cuando estos dos oligonucleótidos se recuecen entre sí, las dos marcas están próximas entre sí, extinguiendo de ese modo la fluorescencia. Los ácidos nucleicos diana, sin embargo, compiten por la unión a la diana, dando como resultado un incremento de la fluorescencia de la sonda inferior al que proporcionalmente se esperaría con la concentración creciente de ácido nucleico diana (Morrison L. et al., Anal. Biochem., Vol. 183, páginas 231-244 (1989); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.928.862).

También se conocen en la técnica sondas lineales de doble hebra modificadas por acortamiento de uno de los dos oligonucleótidos complementarios en unas pocas bases para elaborar una sonda lineal de doble hebra parcial. En dichas sondas lineales de doble hebra de la técnica anterior, el oligonucleótido más largo ha sido marcado en el extremo con un fluoróforo y el oligonucleótido ligeramente más corto ha sido marcado en el extremo con un extintor. En la forma de doble hebra, la sonda es menos fluorescente debido a la íntima proximidad del fluoróforo y el extintor. En presencia de una diana, sin embargo, el oligonucleótido extintor más corto es desplazado por la diana. Como resultado, el oligonucleótido más largo (en forma de un híbrido sonda-diana) se vuelve sustancialmente más fluorescente.

Las sondas de doble hebra conocidas en la técnica anterior que tienen oligonucleótidos de longitudes desiguales presentan una discriminación completa entre una diana perfectamente emparejada y dianas con emparejamientos erróneos de un solo nucleótido. Asimismo, estas sondas no tienen cinéticas de reacción óptimas especialmente cuando se encuentran presentes bajas cantidades de ácido nucleico diana. (Li et al., Nucleic Acids Research, Vol. 30, No. 2, e5 (2002)).

La detección de ARN virales presenta ciertos desafíos, que no son planteados para detectar los ADN de interés. Las sondas de la técnica anterior son adecuadas para la detección de ARN virales, pero podrían ser mejoradas. En primer lugar, algunas dianas de ARN viral son propensas a rápidas mutaciones en los organismos de sus anfitriones. Para asegurarse de que las secuencias de ARN viral mutado son detectadas junto con las denominadas secuencias "de tipo salvaje", las sondas de ácido nucleico utilizadas para detectar los ARN virales deben ser tolerantes a los emparejamientos erróneos, pero a pesar de ello suficientemente específicas para evitar la interacción con ácidos nucleicos no diana (esto es, resultados falsos positivos). Muchas de las sondas de la técnica anterior son sensibles a los cambios de un solo nucleótido, y por lo tanto, no son óptimas para la detección de ácidos nucleicos virales.

Adicionalmente, los ARN virales a menudo deben ser sometidos a transcripción inversa a ADN antes de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de interés. Desafortunadamente, los autores de la presente invención han descubierto que algunas sondas de ácido nucleico de la técnica anterior pueden interferir en la transcripción inversa (esto es, copiado enzimático de secuencias de ARN a secuencias de ADN).

También es deseable que las sondas de ácido nucleico sean capaces de detectar sensiblemente cantidades tanto pequeñas como grandes de ácidos nucleicos de interés. Algunas sondas de ácido nucleico de la técnica anterior no están bien adaptadas para detectar una pequeña cantidad de ácidos nucleicos de interés. Otras sondas de ácido nucleico de la técnica anterior no están bien adaptadas para la detección sensible de grandes cantidades de ácidos nucleicos.

A la vista de lo anterior, existe la necesidad de una sonda: a) cuyas secuencias puedan ser fácilmente manipuladas, b) los oligonucleótidos sean fáciles de diseñar sin la limitación de ser capaces de formar tallos o bucles, c) haya una elevada tolerancia a los emparejamientos erróneos, y/o d) los oligonucleótidos sean adecuados para las reacciones de RT-PCR en tiempo real.

## 50 **Compendio de la Invención**

La presente descripción se refiere en general a sondas de hibridación de ácido nucleico de doble hebra y métodos de utilización de las mismas. La sonda de la presente solicitud se puede utilizar de cualquier manera adecuada, y está particularmente bien adaptada para la amplificación mediante PCR y la hibridación de sondas utilizando un único recipiente de reacción y una única mezcla de reactivos.

La presente descripción proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende un primer ácido oligonucleico y un segundo ácido oligonucleico. El primer ácido oligonucleico está marcado con un fluoróforo y es sustancialmente complementario a un ácido nucleico de interés, de manera que cuando el ácido nucleico de interés está presente, el primer ácido oligonucleico se puede unir al ácido nucleico de interés. El segundo ácido oligonucleico tiene una molécula extintora y es sustancialmente complementario al primer ácido oligonucleico. Por consiguiente, el primer y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí para formar un ácido nucleico de doble hebra. Cuando el primer ácido oligonucleico está unido al segundo ácido oligonucleico, la emisión fluorescente del fluoróforo unido al primer ácido oligonucleico es extinguida (esto es, detectablemente menor que la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos entre sí). La unión del primer ácido oligonucleico al ácido nucleico de interés, por lo tanto, aumenta la fluorescencia en un sistema de ensayo,

indicando de ese modo si está presente el ácido nucleico de interés. El primer ácido oligonucleico comprende "m" nucleobases contiguas sustancialmente complementarias a un ácido nucleico de interés, y el segundo ácido oligonucleico comprende "n" nucleobases contiguas sustancialmente complementarias al primer ácido oligonucleico, donde "m" y "n" son números enteros seleccionados independientemente, y cuando m es menor de 25, n es hasta la mitad que m; cuando m es de 26 a 29, n es de 8 a 13; cuando m es de 30 a 34, n es de 8 a 15; cuando m es de 35 a 39, n es de 8 a 20; cuando m es de 40 a 44, n es de 9 a 25; cuando m es de 45 a 49, n es de 10 a 30; cuando m es de 50 a 54, n es de 10 a 35; cuando m es de 55 a 59, n es de 10 a 40; cuando m es de 60 a 64, n es de 11 a 45; cuando m es de 65 a 69, n es de 11 a 50; cuando m es de 70 a 75, n es de 15 a 55.

La presente descripción también proporciona una sonda de ácido nucleico en la que el primer ácido oligonucleico, y más largo, es sustancialmente complementario a un ácido nucleico de interés y comprende un extintor. El segundo ácido oligonucleico, y más corto, comprende un fluoróforo. El primer ácido oligonucleico es sustancialmente complementario al segundo ácido oligonucleico, lo que permite la hibridación simultánea del primer ácido oligonucleico con el segundo ácido oligonucleico, y la extinción de la fluorescencia del segundo ácido oligonucleico. Cuando el primer ácido oligonucleico está unido a un ácido nucleico de interés, el segundo ácido oligonucleico es desplazado y la emisión fluorescente del fluoróforo es detectablemente mayor que cuando está recocado al primer ácido oligonucleico.

La presente descripción también proporciona un método para la detección y cuantificación de un ácido nucleico de interés en una muestra de ensayo utilizando cualquier realización de la sonda de ácido nucleico de la presente invención descrita en la presente memoria. Por ejemplo, la presente descripción proporciona un método para cuantificar ARN en una muestra de ensayo en el que la muestra se pone en contacto con reactivos de amplificación de ácido nucleico y reactivos de transcripción inversa en condiciones que permitan la transcripción inversa, y después/también la amplificación del ácido nucleico de manera que se produzca y amplifique el ADNc. La mezcla se pone en contacto con posterioridad o simultáneamente con una sonda de ácido nucleico de la presente descripción como se describe en la presente memoria, donde el primer y el segundo ácido oligonucleico de la sonda no se unen entre sí y/o al ARN diana, a la temperatura de la etapa de transcripción inversa.

La presente descripción también proporciona un método para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico de interés en una muestra de ensayo en el que la muestra se pone en contacto con reactivos de amplificación de ADN para amplificar una porción del ácido nucleico de interés, y una primera sonda de ácido oligonucleico que tiene un fluoróforo y un extintor, y es específico para el ácido nucleico amplificado. Antes, durante o después de la adición del primer ácido oligonucleico de hebra sencilla, se añade el segundo ácido oligonucleico que comprende un extintor a una razón de manera que el segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico de la mezcla puede ser menor de uno, y de manera que el primer y el segundo ácido oligonucleico forman un dúplex en solución.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para cuantificar el ARN en una muestra de ensayo como se expone en la reivindicación 1 adjunta. La presente invención proporciona adicionalmente el uso de sondas de ácido nucleico como se expone en la reivindicación 11 en el método mencionado anteriormente.

## **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La **Figura 1A-F** presenta gráficamente los datos de la curva de fusión de sondas de ácido nucleico de la presente descripción sin o con oligonucleótidos diana emparejados erróneamente (como se indica después de cada curva). (A) 520-20/que-16; (B) 520-20/que-14; (C) 520-20/que-12; (D) 520-31/que-14; (E) 520-20/que-12; (F) 520-31/que-14. "m" indica la longitud de las nucleobases contiguas del ácido oligonucleico marcado con FAM sustancialmente complementario a la diana, mientras "n" representa la longitud de las nucleobases contiguas del ácido oligonucleico extintor marcado con DABCYL sustancialmente complementario al ácido oligonucleico marcado con FAM.

La **Figura 2 A-C** ilustra la comparación de los gráficos de amplificación por RT-PCR en tiempo real del transcrito de tipo salvaje con los de los transcritos mutados (como se indica después de cada curva).

La **Figura 3A-B** representa gráficamente la medida en tiempo real de la síntesis del amplicón durante las reacciones de RT-PCR utilizando el conjunto de sondas lineales parcialmente de doble hebra lin-41/que-23 utilizando (A) transcritos molde de tipo salvaje de VIH y (B) transcritos de control interno a 100 copias por mezcla de reacción.

La **Figura 4A-B** representa las medidas en tiempo real de la síntesis del amplicón durante las reacciones de RT-PCR utilizando el conjunto de sondas lin-41/que-22 con (A) transcritos molde de tipo salvaje de VIH y (B) transcrito de control interno a 100 copias por mezcla de reacción.

La **Figura 5A-D** presenta gráficamente los datos de los gráficos de amplificación por RT-PCR en tiempo real del transcrito de tipo salvaje detectado por medio de la sonda 1 x FAM (slin-47), la sonda 2 x FAM (dfam-50) o la sonda 3 x FAM (fam-650) (como se indica después de cada curva) a un número de copias del transcrito de 10 copias (A), 10e3 copias (B), 10e5 copias (C) o 10e6 copias (D) por reacción de PCR. Cada una de las sondas de ácido oligonucleico lineal marcado con FAM fue extinguida por los oligos sque-15BH y bhq-5015.

La **Figura 6** presenta gráficamente los datos de los gráficos de amplificación por RT-PCR en tiempo real de los transcritos con 0, 2, 3, 4 o 5 mutaciones (como se indica después de cada curva).

**Descripción Detallada**

5 La presente descripción proporciona sondas de ácido nucleico como se describe más abajo útiles para detectar la presencia de un ácido nucleico de interés (también denominado comúnmente diana). Por supuesto, el primer ácido oligonucleico también se puede unir a porciones amplificadas del ácido nucleico de interés. Para facilitar la descripción y la comprensión, las referencias a los ácidos nucleicos de interés o "dianas" hacen referencia a estos radicales encontrados en una muestra de ensayo y a las copias amplificadas de porciones de estos ácidos nucleicos, a menos que se indique específicamente lo contrario.

10 La presente descripción proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende un primer ácido oligonucleico y un segundo ácido oligonucleico. El primer ácido oligonucleico está marcado con un fluoróforo y es sustancialmente complementario a un ácido nucleico de interés, de manera que cuando el ácido nucleico de interés está presente, el primer ácido oligonucleico se puede unir al ácido nucleico de interés. Para los fines de la presente descripción, el término "sustancialmente complementario" significa que un 80% o más de las nucleobases de una hebra de la sonda encuentra su compañero de unión de Watson-Crick en la otra hebra de la sonda (o en el ácido nucleico de interés) en un alineamiento de manera que los nucleótidos correspondientes pueden hibridar entre sí. La unión del primer ácido oligonucleico al ácido nucleico de interés evita que el segundo ácido oligonucleico se una al primer ácido oligonucleico de la sonda. El segundo ácido oligonucleico tiene una molécula de extintor y también es sustancialmente complementario al primer ácido oligonucleico. Por consiguiente, el primer y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí cuando el ácido nucleico de interés no está presente para formar un ácido nucleico de doble hebra. Cuando el primer ácido oligonucleico está unido con el segundo ácido oligonucleico, la emisión fluorescente del fluoróforo unido al primer ácido oligonucleico es extinguida (esto es, cambia de manera detectable, y preferiblemente disminuye, en comparación con la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos). La unión del primer ácido oligonucleico al ácido nucleico de interés, por lo tanto, cambia y preferiblemente aumenta la fluorescencia en un sistema de ensayo, indicando de ese modo si el ácido nucleico de interés está presente. En una realización, el primer ácido oligonucleico contiene 15-75 nucleobases ("m") sustancialmente complementarias a una diana, y el segundo ácido oligonucleico contiene "n" nucleobases sustancialmente complementarias al primer ácido oligonucleico, mientras "n" es significativamente más corto que "m". El segundo ácido oligonucleico puede tener cualquier longitud adecuada siendo la consideración primaria que cuando el ácido nucleico de interés no está presente, el segundo ácido oligonucleico se debe unir al primer ácido oligonucleico en condiciones de temperatura y disolvente en las que se utilizará la sonda para inferir la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés en una muestra de ensayo.

35 La tabla 1 muestra las longitudes preferidas y más preferidas del primer y el segundo ácido oligonucleico incorporados a las sondas de doble hebra de esta realización de la presente "descripción".

Tabla 1

Primer Ácido Oligonucleico*	Segundo Ácido Oligonucleico **	
	Preferido	Más Preferido
< 25	< 13	6-10
25-30	8-13	8-10
31-34	8-15	10-14
35-39	8-20	12-18
40-44	9-25	12-22
45-49	10-30	15-28
50-54	10-35	25-32
55-59	10-40	28-35
60-64	11-45	30-40
65-69	11-50	35-45
70-75	15-55	48-50
* Longitud en nucleobases ("m") sustancialmente complementarias a la diana. ** Longitud en nucleobases ("n") sustancialmente complementarias a un primer ácido oligonucleico.		

40 Si bien no se desea adherirse a ninguna teoría concreta, se cree que la porción de hebra sencilla larga del primer ácido oligonucleico favorece fuertemente la unión del primer ácido oligonucleico al ácido nucleico diana de interés incrementando de ese modo la sensibilidad de la sonda y mejorando en ciertas condiciones la cinética de la reacción

de detección. Adicionalmente, la longitud del primer ácido oligonucleico permite el uso de condiciones de hibridación que permiten la hibridación de los emparejamientos erróneos.

Los ácidos oligonucleicos son oligómeros de nucleobases de origen natural o modificadas. Si bien la guanina, adenina, timidina, uridina, citosina, y opcionalmente inosina y/o el indol, se encuentran entre las nucleobases preferidas incorporadas a los ácidos oligonucleicos de la presente invención, se puede incorporar cualquier nucleobase adecuada a las sondas de la presente invención. Los ácidos oligonucleicos no son necesariamente ácidos o residuos de ácidos. Más bien un ácido oligonucleico según se utiliza en la presente memoria es un polímero de nucleobases o análogos de nucleobases que son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tal como el tipo de emparejamiento de bases de Watson-Crick, o similar. Muy frecuentemente, los monómeros están conectados por medio de enlaces fosfodiéster. Menos frecuentemente, los monómeros están conectados por análogos de enlaces fosfodiéster, tales como polímeros (desoxirribosil)fosfonilo o polímeros de fosfortioato. Menos comúnmente también se emplean ácidos peptidnucleicos, referidos normalmente en la técnica como PNA, en los que las nucleobases están conectadas en secuencia por un polímero que contiene enlaces amida a intervalos regulares (Nielsen et al., Science, Vol. 254: 1497-1500 (1991)).

Los métodos de síntesis de los ácidos oligonucleicos incorporados a las sondas de la presente invención son bien conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquier método adecuado de obtención de los ácidos oligonucleicos de la presente invención.

Un fluoróforo, o una "marca fluorescente", puede ser cualquier radical adecuado capaz de emitir luz. La luz puede ser generada químicamente, biológicamente, en respuesta a fotones excitacionales, o a partir de cualquier otra causa adecuada. Preferiblemente, los fluoróforos son colorantes orgánicos fluorescentes derivatizados para el anclaje a los ácidos oligonucleicos de la sonda a través de un radical de unión. Cuando se utilizan polímeros de ribosilo o desoxirribosilo para conectar las nucleobases entre sí los colorantes se pueden derivatizar ventajosamente para que se conecten al carbono 3' terminal o al carbono 5' terminal del polímero.

Los fluoróforos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen (sin limitación) los colorantes Violeta/Azul ( $E_{m_{max}}$  375-491 nm) 7-metoxicumarin-3-carboxi, AMCA-X (7-aminocoumarin-X), 6-MI o 6-MAP (6-metil-8-(2-desoxi-(3-D-ribofuranosil)isoxantopteridina); los colorantes Verde/Amarillo ( $E_{m_{max}}$  492-585 nm) DTAF (4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína, 6-FAM (fluoresceína, 6-carboxifluoresceína), Dansil-X (6-((5-dimetilaminonafaleno-1-sulfonil)amino)hexanoato, 6-JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), HEX (hexaclorofluoresceína), BODIPY-TMR-X (sustituto de tetrametilrodamina), PyMPO (bromuro de 1-(3-carboxibencil)-4-(5-(4-metoxifenil)oxazol-2-il)piridinio), TAMRA-X (6-(tetrametilrodamina-5(6)-carboxamido)hexanoato); los colorantes Naranja ( $E_{m_{max}}$  586-647 nm) derivados de rodamina BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, ROX (carboxirrodamina), VIC (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), NED (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) y los colorantes Rojos ( $E_{m_{max}}$  647-700 nm) como carboxinaftofluoresceína.

Un extintor según se utiliza en la presente memoria es un radical que disminuye la luz emitida por el fluoróforo a la longitud de onda a la cual se mide dicha señal, o es un radical fluorescente que sirve para desplazar la longitud de onda de la luz emitida por el fluoróforo de la sonda de ácido nucleico. Los extintores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen (sin limitación) DABCYL (ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), QSY-7 (9-[2-[[4-[[[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]carbonil]-1-piperidinil]sulfonil]fenil]-3,6-bis(metilfenilamino)), BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 (Biosearch Technologies Inc., 2003, Núms. de Cat. BG5-5041T, BG5-5042T, y BGS-5043T) y TAMRA (6-(tetrametilrodamina-5(6)-carboxamido)hexanoato). Adicionalmente, un extintor puede ser un colorante orgánico, que puede ser fluorescente o no, dependiendo de la realización de la invención.

En otra realización más, la presente invención comprende una sonda donde el primer y el segundo ácidos oligonucleicos comprenden nucleobases adicionales que no son complementarias al ácido nucleico de interés o al primer ácido nucleico, respectivamente, en el extremo 5' o el extremo 3'.

En otra realización la presente invención comprende una sonda donde la razón del segundo ácido oligonucleico que comprende el extintor con respecto al primer ácido oligonucleico que comprende el fluoróforo puede ser mayor de 1,1. Adicionalmente, otra realización comprende una sonda en la cual la razón del segundo ácido oligonucleico que comprende el extintor con respecto al primer ácido oligonucleico que comprende el fluoróforo puede ser mayor de 0,1 y menor de 0,9.

En otra realización de la sonda de la presente invención el primer ácido oligonucleico comprende dos radicales marcadores, un fluoróforo y un extintor. La incorporación de un extintor (además del fluoróforo) en el primer ácido oligonucleico reduce la emisión fluorescente de fondo (o señal de fondo) que se produciría cuando el primer ácido oligonucleico no se uniera a la diana, ni al segundo ácido oligonucleico que comprende un extintor. Otra realización comprende una sonda en la que la razón molar del segundo ácido oligonucleico (que comprende un extintor) con respecto al primer ácido oligonucleico (que comprende un fluoróforo y un extintor) es mayor de 0,1 y menor de 0,9. Adicionalmente, otra realización comprende una sonda en la que la razón molar del segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico (con dos radicales marcadores) es mayor de 1,1.

Para mejorar la señal fluorescente de la sonda de ácido nucleico de la presente invención, se puede unir más de un fluoróforo al ácido oligonucleico que se une a la diana. Las sondas de la presente invención que comprenden más de un fluoróforo preferiblemente emiten sustancialmente más señal fluorescente que las sondas equivalentes que comprenden solamente un fluoróforo. Inesperadamente, se ha descubierto que las sondas que contienen al menos tres fluoróforos son tolerantes a los emparejamientos erróneos (esto es, con una complementariedad por debajo de la perfecta) con las moléculas diana. Esto puede resultar especialmente ventajoso cuando el ácido nucleico diana es altamente polimórfico como en el caso de las porciones de VIH-1 y otros retrovirus. Debido a que la tolerancia a los emparejamientos erróneos de las sondas de la presente invención es independiente del número de fluoróforos unidos al primer ácido oligonucleico de la sonda, y a que una sonda con más de un fluoróforo muestra la misma tolerancia elevada para las dianas con 2, 3 o 4 emparejamientos erróneos que una sonda de longitud similar con un solo fluoróforo, las sondas de la presente invención están particularmente bien adaptadas a la detección y cuantificación de secuencias diana virales.

En otra realización, la sonda de ácido nucleico de la presente invención comprende tres ácidos oligonucleicos, el primer ácido oligonucleico comprende un fluoróforo y el segundo comprende un extintor. El tercer ácido oligonucleico preferiblemente comprende también un extintor. Si bien no se desea estar vinculado a ninguna teoría concreta, se cree que la incorporación de un extintor adicional al tercer ácido oligonucleico reduce la emisión fluorescente del fondo (o señal de fondo). Generalmente, la señal de fondo es la emisión de fluorescencia que no está causada por la unión de un ácido oligonucleico marcado fluorescentemente de la sonda a un ácido nucleico diana de interés.

En otra realización, el ácido oligonucleico más largo comprende un extintor y el ácido oligonucleico más corto comprende un fluoróforo. Adicionalmente, esta realización comprende una sonda en la que el primer y el segundo oligonucleótidos comprenden nucleobases adicionales que no son complementarias al ácido nucleico de interés y al primer oligonucleótido, respectivamente, en los extremos 5' y 3'. Adicionalmente, tanto el primer como el segundo ácido oligonucleico también pueden comprender una pluralidad de radicales marcadores. Por ejemplo, tanto el primer ácido oligonucleico como el segundo ácido oligonucleico pueden comprender tanto un fluoróforo como un extintor. Típicamente, el fluoróforo y el extintor se incorporan a los ácidos oligonucleicos de manera que cuando se unen a una secuencia de oligonucleótidos no marcada (p. ej., una diana) el fluoróforo y el extintor se separan y el fluoróforo puede emitir luz. Sin embargo, cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico de la sonda se unen entre sí el fluoróforo del primer ácido oligonucleico se pondrá en íntima proximidad con el extintor del segundo ácido oligonucleico, así como a la inversa (esto es, el fluoróforo del segundo ácido oligonucleico se pone en íntima proximidad con el extintor del primer ácido oligonucleico). De este modo, tanto el primer como el segundo ácido oligonucleico pueden emitir luz en presencia de una diana, pero son mutuamente extinguidos en ausencia de la diana. Además, el primer y el segundo ácido oligonucleico de esta realización pueden comprender nucleobases adicionales que no son complementarias al ácido nucleico de interés o al primer ácido nucleico, respectivamente, en el extremo 5' o 3'.

Adicionalmente, esta realización comprende una sonda de ácido nucleico donde la razón del primer ácido oligonucleico que comprende el extintor con respecto al segundo ácido oligonucleico que comprende el fluoróforo es mayor de 1,1. En otra realización más, el primer ácido oligonucleico comprende un extintor adicional. Esta realización permite una sonda en la que la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 0,1 y menor de 0,9. Asimismo, esta realización permite una sonda en la que la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 1,1.

En una realización preferida, la diferencia en la señal de fluorescencia entre la forma de doble hebra cuando el fluoróforo y el extintor están cerca, y el estado hibridado con la diana cuando el fluoróforo está separado del extintor puede diferir hasta un factor de 20. Este efecto es debido al hecho de que cuando ambos están en íntima proximidad hay una extinción relativamente eficaz del fluoróforo, mientras que, cuando el primer ácido oligonucleico está recocado al ácido nucleico diana, éste es separado del segundo ácido oligonucleico (que comprende un extintor) y el fluoróforo ya no es extinguido. Según se utiliza en la presente memoria, el término "extinción" hace referencia a cualquier procedimiento por medio del cual cuando una molécula de fluoróforo y una molécula de extintor están muy próximas, se produce una pérdida sustancial de fluorescencia. Incluidas en el grupo de extintores se encuentran moléculas no fluorescentes y moléculas fluorescentes, que pueden aceptar energía lumínica del fluoróforo.

En una realización preferida, el extremo 3' del primer ácido oligonucleico solamente, o junto con el extremo 3' del segundo ácido oligonucleico de la sonda se vuelve/se vuelven incapaces de extenderse por medio de una polimerasa de ácido nucleico, para evitar la interferencia con la etapa de polimerización por PCR por medio de la cual se evita la reducción de la eficacia de la amplificación por etapas.

En otra realización de la presente invención, el primer ácido oligonucleico, o el primer y el segundo ácido oligonucleico de la sonda de doble hebra se vuelven insensibles a la degradación por la actividad exonucleasa 5'→3' de una polimerasa de ácido nucleico. Preferiblemente, el extremo 5' del ácido oligonucleico se vuelve resistente a la digestión incluyendo una o más conexiones internucleótido modificadas en el extremo 5' del ácido oligonucleico. Como mínimo, la conexión internucleótido del extremo 5' debe ser modificada, sin embargo, se pueden modificar todas las conexiones internucleótido del oligonucleótido. Dichas modificaciones internucleótido pueden incluir

conexiones modificadas del tipo utilizado en la síntesis de oligonucleótidos anti-sentido. Los ejemplos de tales conexiones resistentes a las nucleasas incluyen conexiones de ácido peptidonucleico (PNA), p. ej., Nielsen et al., Science. Vol. 254, páginas 1497-1500 (1991), y otras conexiones resistentes a nucleasas similares. Alternativamente, el extremo 5' se puede volver resistente a la degradación por la actividad exonucleasa 5'→3' añadiendo una secuencia que no sea complementaria al ácido nucleico de interés, o mediante la adición de un radical derivado en el extremo 5' del ácido oligonucleico.

Ventajosamente, cualquiera de las sondas descritas más arriba, cada una de las cuales comprende dos ácidos oligonucleicos, puede ser utilizada en un método para determinar la presencia o la cantidad de un ácido nucleico diana. En los siguiente métodos, cualquier ácido nucleico adecuado de interés puede ser el ácido nucleico diana. De acuerdo con la invención, el ácido nucleico diana es ARN, tal como ARN viral o ARNm. En ciertas realizaciones, el ARN diana es sometido a transcripción inversa preferiblemente antes de la amplificación, cuya amplificación también se lleva a cabo preferiblemente en el mismo tubo y mezcla de reacción que la etapa de transcripción inversa.

La presente descripción sobre la detección, o cuantificación, de un ácido nucleico de interés en una muestra de ensayo comprende mezclar la muestra de ensayo con reactivos de amplificación de ADN para amplificar una porción del ácido nucleico de interés. Los reactivos pueden incluir opcionalmente reactivos de transcripción inversa. La mezcla de los reactivos de amplificación y el ácido nucleico de interés se incuba después en condiciones adecuadas para la transcripción inversa del ARN diana en un ADN complementario diana si procede, y después para amplificar el ADN diana. El método también comprende añadir una sonda fluorescente de ácido nucleico que comprende un primer ácido oligonucleico con un fluoróforo y un segundo ácido oligonucleico con un extintor tal como los descritos más arriba, y medir la fluorescencia de la sonda fluorescente como una indicación de que la muestra de ensayo contiene el ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, la sonda se pone en contacto con el ácido nucleico de interés antes o sustancialmente simultáneamente con los reactivos de amplificación, y opcionalmente se mezcla con los reactivos de amplificación antes de poner en contacto los reactivos de amplificación con el ácido nucleico de interés. En otras realizaciones, la sonda se pone en contacto con el ácido nucleico de interés después de incubar el ácido nucleico de interés y los reactivos de amplificación en condiciones de amplificación adecuadas (con el fin de amplificar una porción del ácido nucleico de interés).

Los reactivos de amplificación hacen referencia a los productos químicos, aparte de la secuencia del ácido nucleico diana, necesarios para realizar el proceso de la PCR. Estos productos químicos se pueden clasificar convenientemente en cuatro clases de componentes: (i) un tampón acuoso, a menudo incluye sin limitación una sal de magnesio, (ii) sustratos de amplificación, tales como los cuatro ribonucleótidos trifosfato (NTP) o preferiblemente al menos cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) en la amplificación basada en la polimerización o ATP en la amplificación basada en la ligación, (iii) uno o más cebadores o sondas oligonucleotídicas (normalmente dos cebadores para cada secuencia diana, definiendo las secuencias los extremos 5' de las dos hebras complementarias de la secuencia diana de doble hebra cuando se emplea la PCR), y (iv) una enzima de amplificación tal como una polinucleótido polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa para PCR o ARN polimerasa para TMA), o una ligasa. También se pueden incluir reactivos adicionales o aditivos a discreción del artesano experto y la selección de estos reactivos está en el conocimiento práctico del experto en la técnica. Por supuesto, cuando se utilizan los reactivos de amplificación para ocasionar tanto la transcripción inversa como la amplificación, también se pueden incluir reactivos para la transcripción inversa en los reactivos de amplificación. La selección de los reactivos de amplificación, de acuerdo con el método de la reacción de amplificación utilizado, está en el conocimiento práctico del experto en la técnica.

En las realizaciones que emplean etapas de amplificación y detección "homogéneas", esto es, cuando se realizan la amplificación y la detección por hibridación de la sonda combinadas en una única mezcla de reacción en un único tubo: (i) cualquiera de los dos ácidos oligonucleicos de la sonda preferiblemente no bloquean o interfieren de otro modo o participan en la PCR u otra etapa de amplificación; (ii) ninguno de los ácidos oligonucleicos de la sonda es degradado por la enzima (p. ej., por la actividad exonucleasa 5'→3' de una enzima polimerasa); y (iii) los ácidos oligonucleicos de la sonda preferiblemente no son extendidos o modificados de otro modo por la enzima, p. ej., la actividad de polimerización 5'→3' de la polimerasa.

En otra realización de la presente descripción, se añade una cantidad adicional del segundo ácido oligonucleico (que comprende un extintor) al recipiente antes de cerrar el recipiente e incubar la mezcla de reacción en condiciones de amplificación con el fin de obtener una razón molar del segundo ácido oligonucleico que comprende un extintor con respecto al primer ácido oligonucleico que comprende un fluoróforo que es mayor de 1, opcionalmente no menor de 1,1 o 1,2, y es menor de 20, preferiblemente no mayor de 5, más preferiblemente no mayor de 2,5, aún más preferiblemente no mayor de 2, y opcionalmente no es mayor de 1,5.

En una realización preferida de la presente descripción, se evita que la sonda interfiera, o participe, en la etapa de polimerización por PCR conectando al extremo 3' del ácido nucleico un radical orgánico o inorgánico capaz de bloquear la polimerización del ácido nucleico conocido en la técnica. Ventajosamente, este radical bloqueador de la polimerización puede ser un fluoróforo o una molécula de extintor y se puede anclar a uno o a ambos ácidos oligonucleicos de la sonda por medio de un radical conector, o convirtiendo en nucleótido terminal 3' en un didesoxinucleótido. De un modo similar, los ácidos oligonucleicos de la sonda pueden ser totalmente o parcialmente



un PNA de manera que el ácido oligonucleico de la sonda no pueda cebar la polimerización mediada por enzima. Alternativamente, el extremo 3' del ácido oligonucleico se vuelve refractario a la actividad de extensión 5'→3' de una polimerasa al incluir una o más conexiones internucleótido resistentes a la polimerasa modificadas en el extremo 3' del oligonucleótido, tal como, sin limitación, una conexión fosfonato o fosforotioato. De un modo similar, se puede anclar al extremo 3' de uno o ambos ácidos oligonucleicos de la sonda una secuencia no complementaria al ácido nucleico de interés de manera que el emparejamiento erróneo impida o evite la polimerización mediada por enzima.

En otra realización preferida, los ácidos oligonucleicos de la sonda de la presente descripción se pueden volver resistentes o refractarios a la digestión con exonucleasa. Los métodos adecuados para impedir o evitar la digestión con exonucleasa incluyen (sin limitación) la introducción de una extensión 5' que no sea complementaria al ácido nucleico de interés, la adición de una conexión no fosfodiéster entre dos bases nucleotídicas del ácido oligonucleico, y la adición de un radical de bloqueo orgánico o inorgánico conocido en la técnica (per se) al extremo 5' de uno o ambos ácidos oligonucleicos.

De un modo similar, la degradación enzimática de los ácidos oligonucleicos de la sonda puede ser impedida o evitada utilizando una enzima de amplificación que carezca de dicha actividad. En el caso de las reacciones basadas en la amplificación, por ejemplo, se puede utilizar una polimerasa que carezca de actividad exonucleasa 5'→3'. Las polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 5'→3' son conocidas en la técnica e incluyen sin limitación el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, la ADN polimerasa de T4, y la ADN polimerasa de T7, el fragmento Stoffel de la polimerasa Taq, y otras ADN polimerasas 5'→3' exonucleasa minus similares.

La polimerasa también se puede volver inactiva opcionalmente, al menos con respecto a su actividad exonucleasa, durante la etapa de hibridación. Dicha inactivación se puede lograr de varias maneras incluyendo (i) la introducción de un inhibidor sensible a la temperatura en la reacción que inhibirá la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa a la temperatura de hibridación, p. ej., un sólido adsorbente, una molécula de anticuerpo específico, u otros inhibidores de polimerasa reversibles o irreversibles; (ii) la utilización de una polimerasa cuya actividad se reduzca enormemente a la temperatura de hibridación; o (iii) la introducción de una etapa de desactivación enzimática antes de la etapa de hibridación que desactiva irreversiblemente la enzima polimerasa, esto es, un período prolongado a temperatura elevada.

En ciertas realizaciones, la eficacia de la transcripción inversa se incrementa utilizando una sonda que comprende un ácido oligonucleico que es complementario a un ARN diana de interés que tiene una  $T_m$  (temperatura de fusión) del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico que es inferior a la temperatura a la cual se incuba la mezcla de reacción durante la transcripción inversa. Si bien no se desea adherirse a ninguna teoría concreta, se cree que, llevando a cabo la etapa de transcripción inversa a una temperatura por encima de cada una de las  $T_m$  de la sonda, la sonda no compite con el ARN diana uniéndose competitivamente a la enzima que media la transcripción inversa.

De un modo similar, en la realización que emplea la transcripción inversa en presencia de la sonda, ninguno (o nada) de los ácidos oligonucleicos de la sonda se une al ARN diana a la temperatura a la cual se produce la transcripción inversa.

## **EJEMPLOS**

La presente descripción y la invención especificadas en las reivindicaciones adjuntas se explicarán adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que solo están destinados a ilustrar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

### **Ejemplo 1. Efecto de la diferencia de longitud entre los dos ácidos oligonucleicos de una sonda de ácido nucleico sobre la tolerancia a los emparejamientos erróneos evaluada mediante el análisis de las curvas de fusión.**

Las reacciones de fusión se realizaron en un sistema de PCR cuantitativa Stratagene Mx4000 M con las siguientes condiciones de los ciclos: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 min; 75 ciclos de mantenimiento durante 1 minuto a un intervalo de temperatura entre 85°C y 10°C con una disminución de 1°C por ciclo. Se registraron las medidas de fluorescencia de la fluoresceína (FAM) durante cada mantenimiento de 1 minuto de los 75 ciclos. Al final de cada ronda, se analizaron los datos y se generaron las curvas de fusión.

La Tabla 2 expone las secuencias de los cebadores de la PCR y las sondas lineales utilizados en este y en los siguientes ejemplos.

Tabla 2

Nombre	Secuencia
<u>Cebadores de la PCR</u>	
FP-29	5' - ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT - 3' (SEQ ID NO:1)
RP-25	5' - CCCCTGCACTGTACCCCCCAATCCC - 3' (SEQ ID NO:2)
RP-24	5' - CCCCTGCACTGTACCCCCCAATCC - 3' (SEQ ID NO:3),
<b>Sondas Lineales<sup>1</sup> marcadas con FAM</b>	
520-20	6-FAM- (5') - <u>ACAGCAGTACAAATGGCAGT</u> - (3')-DABCYL (SEQ ID NO:4)
520-31	6-FAM- (5') - <u>ACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACA</u> - (3')-DABCYL (SEQ ID NO:5)
lin-41	6-FAM-(5') - <u>GCTACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTCCC</u> - (3')-DABCYL (SEQ ID NO:6)
slin-47	6-FAM-(5') - <u>GCACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA</u> <u>A</u> - (3')-DABCYL (SEQ ID NO:7)
dfam-50	6-FAM-(5') - <u>GCACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA</u> <u>ACGC</u> - (3')-6-FAM (SEQ ID NO:8)
fam-650	6-FAM-(5') - <u>GCACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAAT(dT-FAM)TTAAAAGAAAACGC</u> - (3')-6-FAM (SEQ ID NO:9)

<b>Oligos Extintores<sup>2</sup> marcados con DABCYL</b>	
que-12	(5') - <u>GTATTGTA</u> CTGCTGT - (3')-DABCYL (SEQ ID NO: 10)
que-14	(5') - CGG <u>ATTTGTA</u> CTGCTGT - (3')-DABCYL (SEQ ID NO: 11)
que-16	(5') - GACCC <u>ATTTGTA</u> CTGCTGT - (3')-DABCYL (SEQ ID NO: 12)
que-22	DABCYL-(5') - GACCC <u>ATTTGTA</u> CTGCTGTAGC - (3')-DABCYL (SEQ ID NO: 13)
que-23	DABCYL-(5') - TGAGCC <u>ATTTGTA</u> CTGCTGTAGC - (3')-DABCYL (SEQ ID NO: 14)
sque-15BH	5'- <u>TTTGTACTGCTGTGC</u> - (3')-BHQ-1 (SEQ ID NO: 15)
bhq-5015	BHQ-1-(5') - <u>GCGTTTTCTTTTAAA</u> - (3')-BHQ- (SEQ ID NO: 16)
<sup>1</sup> Las secuencias sustancialmente complementarias a las dianas están subrayadas ("m"). <sup>2</sup> Las secuencias sustancialmente complementarias a cada sonda FAM lineal están subrayadas ("n").	

En cada análisis, 100 µl de reacción contenían 1,25 x tampón de RT-PCR (Bicina 62,5 mM, pH 8,05-8,25, acetato de potasio 143,75 mM, glicerol al 10%, EDTA 0,125 mM, albúmina de suero bovino acetilada 0,0125 mg/ml (BSA-acetilada), Tween 20 al 0,078% (v/v), y azida de sodio al 0,025% (p/v)), MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM, ácido oligonucleico ("oligo") marcado con FAM 0,2 µM, oligo extintor marcado con DABCYL 0,2 µM y oligo diana complementaria de hebra sencilla 1 µM que tenía 48 nucleótidos de longitud y comprendía 0, 1, 2, 3, o 4 emparejamientos erróneos con los oligos marcados con FAM (los oligos se obtuvieron de Sigma-Genosys). La longitud del oligo marcado con FAM era de 20 o 31 nucleótidos, mientras el oligo extintor marcado con DABCYL tenía 12, 14 o 16 nucleótidos de longitud. Las Figs. 1A-F muestran las curvas de fusión de una serie de grupos de sondas lineales de doble hebra en presencia o ausencia de oligos diana con diferente número de emparejamientos erróneos, que oscilaba entre 0 y 4. La intensidad de fluorescencia FAM se midió como una función de la temperatura. (A) 520-20/que-16; (B) 520-20/que-14; (C) 520-20/que-12; (D) 520-31/que-14; (E) 520-20/que-12; (F) 520-31/que-14. Las posiciones de los emparejamientos erróneos (en adelante "emp. erróneos") para (A) - (C) son las siguientes: 1 mis es el 12<sup>o</sup> nucleótido; 2 mis son los nucleótidos 12<sup>o</sup> y 18<sup>o</sup>. Las posiciones de los emparejamientos erróneos para (D) son: 1 mis es el 12<sup>o</sup> nucleótido; 3 mis son los nucleótidos 12<sup>o</sup>, 18<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>. Las posiciones de los emparejamientos erróneos para (E) son: 1 mis es el nucleótido 3<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> o 12<sup>o</sup>; 2 mis son los nucleótidos 9<sup>o</sup> y 12<sup>o</sup>. Las posiciones de los emparejamientos erróneos para (F) son las siguientes: 1 mis es el 12<sup>o</sup>; 2 mis son los nucleótidos 9<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>, el 21<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>, el 24<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>, el 3<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup> o el 9<sup>o</sup> y 12<sup>o</sup>; 3 mis son los nucleótidos 24<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup> o el 12<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>; 4 mis son los nucleótidos 21<sup>o</sup>, 24<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup>. Todas las posiciones de nucleótidos emparejados erróneamente empiezan en el extremo 5' de cada respectiva sonda lineal FAM de VIH.

A temperaturas elevadas, el oligo marcado con FAM y el oligo extintor marcado con DABCYL complementario más corto de cada grupo de sondas lineales de doble hebra se separan, conduciendo de este modo a la restauración de la fluorescencia FAM. En ausencia de oligo diana, estos dos oligos tienden a hibridar gradualmente entre sí a medida que la temperatura de incubación disminuye y forman un dúplex no fluorescente debido a la íntima proximidad del fluoróforo FAM y el extintor DABCYL. Las T<sub>m</sub> de los oligos extintores determinaron las temperaturas de incubación a las cuales se empezaron a formar los dúplex no fluorescentes. El oligo extintor que-16 que tiene una longitud de 16 nucleótidos complementarios (Tabla 2) comenzó la formación de los dúplex no fluorescentes a alrededor de 60°C (Fig. 1A), mientras los oligos extintores de 14 bases (que-14; Tabla 2) y 12 bases (que-12; Tabla 2) la comenzaron a alrededor de 55°C y 50°C, respectivamente (Figs. 1B y C). En presencia de oligos diana con 0 emparejamientos erróneos, los oligos extintores, que eran más cortos y por tanto tenían una T<sub>m</sub> inferior que los oligos diana, fueron incapaces de competir con los oligos diana por la unión a los oligos marcados con FAM, dando como resultado de ese modo la formación de híbridos sonda-diana que emitían fluorescencia (Figs. 1A-F). En presencia de oligos diana con emparejamientos erróneos, el oligo extintor de 12 bases que-12 todavía fue incapaz de competir con los oligos diana con 1 o 2 emparejamientos erróneos por la unión al oligo 520-20 marcado con FAM de 20 bases (Tabla 2) (Fig. 1C); el oligo extintor de 14 bases que-14, por otra parte, todavía era incapaz de competir con el oligo diana con 1 emparejamiento erróneo pero logró unirse al oligo 520-20 con FAM en presencia del oligo diana con 2 emparejamientos erróneos (Fig. 1B). Por el contrario, el oligo extintor de 16 bases que-16 fue capaz de unirse a 520-20 en presencia de 1 emparejamiento erróneo y incluso más en presencia de 2 emparejamientos erróneos (Fig. 1A). Estos resultados demuestran que la extensión de la longitud de un oligo extintor reducía la capacidad de su oligo marcado con FAM complementario para unirse a oligos diana con emparejamientos erróneos. En otras palabras, el aumento de la diferencia de longitud entre el oligo marcado con FAM y su oligo extintor marcado con DABCYL complementario aumenta el nivel de tolerancia del oligo marcado con FAM a los oligos diana con emparejamientos erróneos. A la misma conclusión se puede llegar cuando se comparan las curvas de fusión del grupo de sondas lineales 520-20/que-14 (Fig. 1B) con las de 520-31/que-14 (Fig. 1D). El grupo de sondas 520-31/que-14 fue incluso incapaz de seleccionar el oligo diana con 4 emparejamientos erróneos tan eficazmente como el que tiene 0 emparejamientos erróneos a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas de hibridación (Fig. 1F).

### **Ejemplo 2. Efecto de la diferencia de longitud entre los dos ácidos oligonucleicos de una sonda de ácido nucleico sobre la tolerancia a los emparejamientos erróneos evaluada mediante análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativos.**

Este ejemplo muestra las evaluaciones de tres grupos de sondas diferentes 520-20/que-16, 520-20/que-12 y 520-31/que-14 para determinar sus tolerancias a los emparejamientos erróneos realizando análisis de RT (transcripción inversa)-PCR en tiempo real cuantitativa. Se emplearon cinco transcritos que portaban diferentes mutaciones para someter a ensayo estos tres grupos de sondas. En estos análisis cuantitativos no competitivos, cada reacción de RT-CR de 100 µl contenía 1,25 x tampón RT-PCR (Bicina 62,5 mM, pH 8,05-8,25, acetato de potasio 143,75 mM, glicerol al 10%, EDTA 0,125 mM, albúmina de suero bovino (BSA) con acetilo 0,0125 mg/ml, Tween 20 0,078% (v/v), y azida de sodio 0,025% (p/v)), MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,375 mM de cada desoxinucleótido-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 13,13 unidades de ADN polimerasa rTth (Applied Biosystems), cebador directo para PCR de VIH FP-29 0,6 µM, cebador inverso para PCR de VIH RP-25 1,6 µM (Tabla 2), cebador directo-196 de control interno (CI) 0,1 gM, cebador inverso-310 de CI 0,3 µM, sonda de oligo marcada con FAM 0,2 µM para la detección de los productos de la PCR de VIH, oligo extintor marcado con DABCYL 0,2 µM para extinguir la señal de fluorescencia de la sonda FAM, sonda baliza marcada con VIC 0,1 µM para detectar los productos de la PCR de CI (todos los oligos marcados con fluoróforo y marcados con extintor obtenidos de TriLink), 1x FRETROX (Applied Biosystems) como colorante de referencia para la normalización de la señal, 5.000 copias de transcrito CI y diferentes niveles de patrones de transcritos de tipo salvaje de VIH (0, 4,17 × 10<sup>1</sup>, 4,17 × 10<sup>2</sup>, 4,17 × 10<sup>3</sup>, 4,17 × 10<sup>4</sup> o 4,17 × 10<sup>5</sup> copias

por reacción). Para cuantificar los cinco transcritos por cada uno de los tres grupos de sondas, se utilizó cada transcrito a  $1 \times 10^4$  copias/reacción para llevar a cabo el análisis junto con los patrones de los transcritos de tipo salvaje. Las reacciones de amplificación se realizaron en un sistema Applied Biosystems 7000 Sequence Detection PCR con las siguientes condiciones para los ciclos: 1 ciclo de transcripción inversa a 59°C 30 min; 2 ciclos de amplificación poco restrictiva a 95°C 1 min y 54°C 1 min; 10 ciclos de amplificación muy restrictiva a 95°C 15 seg y 59°C 1 min; y 40 ciclos de amplificación y detección de 95°C 15 seg y 45°C 2 min 30 seg. Las medidas de la fluorescencia se registraron durante cada una de las etapas de 45°C de los 40 ciclos. Al final de cada ronda de PCR en tiempo real, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron las gráficas de amplificación. Las cantidades de los cinco transcritos de la muestra se determinaron utilizando la curva de calibración obtenida de trazar el  $\log_{10}$  del número de copias patrón de VIH frente a sus respectivos ciclos umbral de fluorescencia ( $C_T$ ). Las Figs. 2A-C muestran los gráficos de amplificación de los cinco transcritos utilizando los tres grupos de sondas lineales de doble hebra 520-20/que-16, 520-20/que-12 y 520-31/que-14, respectivamente. Se amplificaron  $1 \times 10^4$  copias de cada transcrito, y se detectó la cantidad de productos de la PCR generados en cada ciclo por uno de los tres grupos de sondas lineales de doble hebra: (A) 520-20/que-16; (B) 520-20/que-12; (C) 520-31/que-14. Para los cinco transcritos, el oligo marcado con FAM 520-20 encontró 0 emparejamientos erróneos para dos de ellos y 2 emparejamientos erróneos para los tres restantes (Tabla 4). Cuando se emparejó con el oligo extintor marcado con DABCYL que-16, la sonda 520-20 apenas detectó los tres transcritos con 2 emparejamientos erróneos (Fig. 2A) y de este modo subestimó sus concentraciones en más de  $\log_{10}$  de 1 (Tabla 3). Por otra parte, cuando se emparejó con un oligo extintor más corto de 4 bases que-12, la sonda 520-20 fue capaz de detectar los tres transcritos con 2 emparejamientos erróneos con una mayor eficacia (Fig. 2B) y solamente subestimó sus cantidades en menos de  $\log_{10}$  de 0,5 (Tabla 4). Estos resultados confirmaron la conclusión del Ejemplo 1 de que la ampliación de la diferencia de longitud entre los dos componentes oligo (el oligo marcado con FAM y su oligo extintor marcado con DABCYL complementario) de una sonda lineal de doble hebra aumenta la eficacia del oligo marcado con FAM para seleccionar oligos diana con emparejamientos erróneos. Esta conclusión fue corroborada adicionalmente por la capacidad del grupo de sondas 520-31/que-14, con una mayor diferencia de longitud de 17 bases entre los dos oligos componentes, para detectar transcritos hasta con 4 mutaciones casi tan eficazmente como el transcrito de tipo salvaje (Fig. 2C). La sonda 520-31, que era 11 bases más larga que 520-20 y tenía que identificar más emparejamientos erróneos para el mismo grupo de los cinco transcritos (Tabla 5), cuantificó que los cinco transcritos estaban entre  $1,3 \times 10^4$  y  $3,1 \times 10^4$  (Tabla 5); este número de copias determinado estaba muy próximo al  $1 \times 10^4$  esperado. En la escala  $\log_{10}$ , la diferencia en el número de copias más alta determinada entre el mutante y el tipo salvaje fue de  $\log_{10}$  de 0,4 que están dentro del  $\log_{10}$  de 0,5 aceptable (Tabla 5). En conclusión, se pueden utilizar sondas parcialmente de doble hebra para cuantificar exactamente muestras de ácido nucleico, y cuando se diseñan apropiadamente, esas sondas son capaces de cuantificar los mutantes tan exactamente como los tipos salvajes.

Tabla 3

Cuantificaciones de los transcritos ( $\log_{10}$ de 4,0 por reacción) con 0 o 2 emparejamientos erróneos utilizando la sonda de doble hebra 520-20/que-16		
Número de Emparejamientos Erróneos	Posiciones de los Emparejamientos Erróneos <sup>1</sup>	Cantidad ( $\log_{10}$ cps/reacción)
0	n/a	4,42
0	n/a	4,41
2	6,12	3,03
2	9,12	2,90
2	12,18	3,37

<sup>1</sup>Las posiciones de los emparejamientos erróneos muestran las posiciones de los nucleótidos emparejados erróneamente empezando en el extremo 5' de la sonda 520-20 con FAM de VIH.  
n/a: no aplicable.

Tabla 4

Cuantificaciones de transcritos (log10 de 4,0 por reacción) con 0 o 2 emparejamientos erróneos utilizando la sonda de doble hebra 520-20/que-12		
<u>Número de Emparejamientos Erróneos</u>	<u>Posiciones de los Emparejamientos Erróneos<sup>1</sup></u>	<u>Cantidad (log 10 cps/reacción)</u>
0	n/a	4,47
0	n/a	4,46
2	6, 12	4,03
2	9, 12	4,13
2	12, 18	4,13

<sup>1</sup>Las posiciones de los emparejamientos erróneos muestran las posiciones de los nucleótidos emparejados erróneamente empezando en el extremo 5' de la sonda 520-20 con FAM de VIH.  
n/a: no aplicable.

Tabla 5

Cuantificaciones de transcritos (log10 de 4,0 por reacción) con 0, 2, 3 o 4 emparejamientos erróneos utilizando la sonda de doble hebra 520-31/que-14		
<u>Número de Emparejamientos Erróneos</u>	<u>Posiciones de los Emparejamientos Erróneos<sup>1</sup></u>	<u>Cantidad (log 10 cps/reacción)</u>
0	n/a	4,50
2	6,12	4,31
3	9, 12, 22	4,31
3	12, 18, 27	4,11
4	21, 24, 25, 27	4,31

<sup>1</sup>Las posiciones de los emparejamientos erróneos muestran las posiciones de los nucleótidos emparejados erróneamente empezando en el extremo 5' de la sonda 520-31 con FAM de VIH.  
n/a: no aplicable.

### **Ejemplo 3 (comparativo). Inhibición de la RT PCR por un oligonucleótido extintor con una Tm más alta que la Temperatura de RT**

5 Para examinar el impacto de la utilización de una sonda con extintor con una Tm que está por encima de la temperatura de incubación de la reacción de RT, se valió el funcionamiento de la combinación de sondas, lin-41 y que-23 (Tabla 2) en un análisis de (RT)-PCR de transcripción inversa en tiempo real. El oligo extintor, que-23, tiene una Tm de 60,27, por encima de los 59°C de la temperatura de incubación de RT. En este análisis cuantitativo competitivo, cada reacción de RT-PCR de 100 µl se llevó a cabo en presencia de tampón 1 x EZ (que contenía Bicina 50 mM, pH 8,2, acetato de potasio 115 mM y glicerol al 8%), Mn(OAc)<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,4 mM de cada desoxinucleótido-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 unidades de inhibidor de ARNasa, 10 unidades de ADN polimerasa Tth (todo de Applied Biosystems), cebador directo de PCR de VIH FP-29 0,2 µM, cebador inverso de PCR de VIH RP-24 1,0 µM, sonda de oligo marcado con FAM lin-41 0,1 µM para la detección de los productos de la PCR de tipo salvaje de VIH oligo extintor marcado con DABCYL que-23 0,2 µM para extinguir la sonda con FAM, sonda baliza marcada con Rojo Texas bpic-7 0,1 µM para detectar los productos de la PCR de control interno (CI), Alexa (Molecular Probes) 0,04 µg/ml como colorante de referencia para la normalización de la señal, 100 copias de transcrito de control interno y diferente número de copias de transcrito de tipo salvaje de VIH (0, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> o 10<sup>6</sup> copias). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un sistema de PCR cuantitativa Stratagene Mx4000 Multiplex con las siguientes condiciones de ciclos: 1 ciclo de transcripción inversa a 95°C 5 seg y 59°C 30 min; 2 ciclos de amplificación poco restrictiva a 95°C 30 seg, 54°C 30 seg y 72°C 30 seg; 10 ciclos de amplificación muy restrictiva a 95°C 30 seg, 59°C 30 seg y 72°C 30 seg; 33 ciclos de amplificación y detección de 95°C 30 seg, 50°C 1 min y 72°C 30 seg. Las mediciones de la fluorescencia se registraron durante cada etapa a 50°C de los 33 ciclos. Al final de cada ronda de PCR en tiempo real, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron las gráficas de amplificación. Las curvas de amplificación de los transcritos de tipo salvaje y de control

interno se muestran en las Figs. 3A y B, respectivamente. Se incubaron simultáneamente siete reacciones, iniciadas cada una con un número diferente de transcritos molde de tipo salvaje de VIH en Mx4000 de Stratagene. La concentración de los amplicones que estuvieron presentes después de cada ciclo de amplificación se determinó midiendo la señal de fluorescencia FAM emanada de los híbridos de sonda-diana durante los últimos 21 segundos de la etapa de recocido. La intensidad de la fluorescencia FAM en cada reacción se midió como una función del ciclo. De los niveles de entrada del transcrito de tipo salvaje que oscilaban entre  $10^1$  y  $10^6$ , se observó una amplificación significativa solamente para los números de copias elevados (esto es, de  $10^4$  a  $10^6$ ), mientras no se registraron señales de fluorescencia para los números de copias bajos de 0 a  $10^3$ . Para la amplificación RT-PCR en tiempo real de los transcritos de control, se utilizaron 100 copias de transcritos de control interno. La cantidad de productos de la PCR de control interno generada en cada ciclo se detectó por medio de la sonda baliza molecular bpic-7 marcada con Rojo Texas. El número de copias del transcrito de tipo salvaje indicado después de cada curva se amplificó en la reacción de RT-PCR junto con las 100 copias del transcrito de control interno. No se observaron señales de fluorescencia para las 100 copias del transcrito de control interno. Estos datos son coherentes con la hipótesis de que el oligo extintor marcado con DABCYL- que-23 con una  $T_m$  de 60,27, superior a los 59°C de la temperatura de RT, hibridaba con la sonda lineal marcada con FAM lin-41 y que el dúplex lin-41/que-23 inhibía la transcripción inversa. La inhibición reducía significativamente la eficacia de la transcripción inversa de los transcritos tanto de tipo salvaje como de control interno. No se observaron señales de fluorescencia por encima de las de referencia a un número de copias bajo ( $0 - 10^3$ ), mientras las curvas de amplificación para un número de copias elevado ( $10^4 - 10^6$ ) tenía un número de ciclos significativamente retrasado y alcanzaba niveles por debajo del máximo.

#### **Ejemplo 4 (comparativo). Eliminación de la inhibición por medio de un ácido oligonucleico extintor con una $T_m$ inferior a la temperatura de RT en la RT-PCR.**

Para evaluar la relación entre la  $T_m$  del oligo extintor y el funcionamiento del análisis de RT-PCR, se utilizó la sonda marcada con FAM, lin-41, combinada con el oligo extintor, que-22 (Tabla 2). El oligo, que-22, tiene una  $T_m$  de 55,86°C, por debajo de la temperatura de incubación de 59°C de la transcripción inversa (RT). Se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativo como se describe en el Ejemplo 3, con la excepción de que el oligo extintor, que-22, fue sustituido por que-23. Los datos resultantes se presentan en las Figs. 4A y 4B. En contraste con los resultados obtenidos en el Ejemplo 3, se encontraron curvas de amplificación típicas para los transcritos tanto de tipo salvaje como de control interno a todos los niveles de copias. Las curvas de amplificación de tipo salvaje a concentraciones del molde de  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  emergieron alrededor de 8 ciclos antes y alcanzaron un nivel máximo superior a 10.000. Incluso a 10 copias por reacción, el nivel de entrada de molde más bajo examinado, se observó una amplificación significativa (~ 2.000 unidades). La amplificación observada estuvo significativamente por encima de la de referencia, demostrando que la combinación de sondas, lin-41/que-22, proporciona una elevada sensibilidad. Por otra parte, el análisis mostró una buena linealidad con un intervalo dinámico amplio; coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0,998 sobre seis logs ( $10$  a  $10^6$ ) de concentración diana. Para las 100 copias de transcrito de control interno, las curvas de amplificación presentaron un perfil típico de PCR competitiva, en el que las señales de fluorescencia del control interno disminuían en respuesta al incremento del número de copias del transcrito de tipo salvaje. Estos datos demuestran la utilidad de una sonda con extintor que tiene una  $T_m$  (para la sonda lineal marcada con FAM) por debajo de la temperatura de incubación RT para la amplificación RT-PCR y la cuantificación.

#### **Ejemplo 5 (comparativo). Intensificaciones de la señal utilizando sondas marcadas con más de una molécula fluorescente.**

Para examinar si las señales de fluorescencia generadas en los análisis de RT-PCR podían intensificadas por medio del uso de sondas lineales que portaban más de una marca fluorescente, se preparó un análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativo con sondas múltiplemente marcadas. Se utilizaron las sondas lineales marcadas con FAM, slin-47, dfam-50 y fam-650 (Tabla 2), junto con dos oligos extintores, sque-15BH y bhq-5015. Ambas sondas de oligos extintores se unen a las tres sondas lineales marcadas con FAM. La sonda slin-47 porta un FAM (1 x FAM) en el extremo 5' y un DABCYL en el extremo 3', mientras la sonda dfam-50 tiene un FAM en ambos extremos 5' y 3' (2 x FAM); la sonda fam-650 posee un FAM interno además de sus dos FAM terminales (3 x FAM). Las reacciones de RT-PCR en este análisis competitivo se llevaron a cabo en condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 3. Cada RT-PCR de 100  $\mu$ l contenía 1 x tampón EZ (que contenía Bicina 50 mM, pH 8,2, acetato de potasio 115 mM y glicerol al 8%), Mn(OAc)<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,4 mM de cada desoxinucleótido-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 unidades de inhibidor de ARNasa, 10 unidades de ADN polimerasa Tth (todo de Applied Biosystems), cebador para PCR directo de VIH FP-29 0,1  $\mu$ M, cebador para PCR inverso de VIH RP-24 1,0  $\mu$ M, sonda oligo marcada con FAM 0,2  $\mu$ M (slin-47, dfam-50 o fam-650) para la detección de los productos de la PCR de tipo salvaje de VIH, oligo extintor marcado con BHQ 0,25  $\mu$ M sque-15BH para extinguir el extremo 5' de la sonda FAM, oligo extintor marcado con BHQ 0,25  $\mu$ M bhq-5015 para extinguir el extremo 3' de la sonda FAM, sonda baliza marcada con Rojo Texas 0,2  $\mu$ M bpic-7BH para detectar los productos de la PCR de control interno (CI), Alexa de 0,04  $\mu$ g/ml como colorante de referencia para la normalización de la señal, 100 copias de transcrito de control interno y diferente número de copias de transcrito de tipo salvaje de VIH (0, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  o  $10^6$  copias). Las reacciones de amplificación se realizaron en un Sistema de PCR Cuantitativa múltiple Mx4000M de Stratagene con las siguientes condiciones de los ciclos: 1 ciclo de transcripción inversa a 59°C 60 min; 2 ciclos de amplificación poco restrictiva a 95°C 1 min y 54°C 1 min; 10 ciclos de amplificación muy restrictiva a 95°C 15 seg y 59°C 1 min; 33 ciclos de amplificación y

5 detección de 95°C 15 seg y 40°C 2 min 30 seg. Las mediciones de la fluorescencia se registraron durante cada una de las etapas a 40°C de los 33 ciclos. Al final de cada ronda de PCR en tiempo real, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron los gráficos de amplificación. Se observaron los perfiles de amplificación típicos a todos los niveles de transcrito de tipo salvaje de entrada por las tres sondas marcadas con FAM. La Figura 5 representa las gráficas de amplificación para el transcrito de tipo salvaje a 10 copias/reacción (A), 10<sup>3</sup> copias/reacción (B), 10<sup>5</sup> copias/reacción (C) y 10<sup>6</sup> copias/reacción (D). A cada número de copias sometido a ensayo, las sondas 3 x FAM en total generaron más señal de fluorescencia que la sonda 2 x FAM, que a su vez emanó en total más señal que la sonda 1 x FAM. Además de un nivel de la señal de fluorescencia superior en total, que aumentaba la sensibilidad del análisis, las sondas lineales con múltiples marcas FAM generaron curvas de amplificación con pendientes más empinadas, facilitando la determinación del ciclo umbral de fluorescencia (C<sub>T</sub>).

#### **Ejemplo 6 (comparativo). Cuantificación de transcritos con o sin mutaciones.**

15 Para examinar la utilidad de las sondas parcialmente de doble hebra para detectar y cuantificar de manera fiable los moldes con emparejamientos erróneos, se utilizó el grupo de sondas fam-650 (3 marcas FAM/sque-15BH + bhq-5015 (Tabla 2) para cuantificar los transcritos con múltiples mutaciones. Cada uno de los cinco transcritos que portaban 0, 2, 3, 4 o 5 mutaciones fue cuantificado en un análisis de RT-PCR en tiempo real. Se determinó el número de copias de transcrito mediante la medición de la DO260. El análisis se normalizó utilizando diferente número de copias de transcrito de tipo salvaje. Las reacciones de RT-PCR en este análisis cuantitativo competitivo se llevaron a cabo en condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 5. Cada reacción de RT-PCR de 100 µl contenía 1 x tampón EZ (que contenía Bicina 50 mM, pH 8,2, acetato de potasio 115 mM y glicerol al 8%), Mn(OAc)<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,4 mM de cada desoxinucleótido-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 unidades de inhibidor de ARNasa, 10 unidades de ADN polimerasa Tth, cebador para PCR directo de VIH FP-29 0,1 µM, cebador para PCR de VIH RP-24 1,0 µM, sonda oligo marcada con FAM 0,15 µM fam-650 para la detección de los productos de la PCR de tipo salvaje de VIH, oligo extintor marcado con BHQ 0,25 µM sque-15BH para extinguir el extremo 5' de la sonda FAM, oligo extintor marcado con BHQ 0,25 µM bhq-5015 para extinguir el extremo 3' de la sonda FAM, sonda lineal marcada con Rojo Texas 0,1 µM trp-34 para detectar los productos de la PCR de control interno (CI), oligo extintor marcado con BHQ 0,1 µM ctrp-15bhq para extinguir el CI Rojo Texas, Alexa de 0,04 µg/ml como colorante de referencia para la normalización de la señal, 200 copias de transcrito de control interno y diferente número de copias de transcrito patrón de tipo salvaje de VIH (0,10,10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>,10<sup>5</sup> o 10<sup>6</sup> copias). Para cuantificar los cinco transcritos, se añadieron 8 x 10<sup>3</sup> copias de cada transcrito en lugar del patrón de tipo salvaje en una reacción RT-PCR y se amplificaron junto con los siete patrones de VIH. Las reacciones de amplificación se realizaron en un Sistema de PCR Cuantitativa Múltiple Mx4000 de Stratagene con las siguientes condiciones para los ciclos: 1 ciclo de transcripción inversa a 59°C 60 min, 2 ciclos de amplificación poco restrictiva a 95°C 1 min y 54°C 1 min; 10 ciclos de amplificación muy restrictiva a 95°C 15 seg y 59°C 1 min; 33 ciclos de amplificación y detección de 95°C 15 seg y 40°C 2 min 30 seg. Las mediciones de la fluorescencia se registraron durante cada etapa a 40°C de los 33 ciclos. Al final de cada ronda de PCR en tiempo real, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron los gráficos de amplificación. La Fig. 6 muestra los gráficos de amplificación de los cinco transcritos. Las cinco curvas se agrupan y emergen hacia arriba en el ciclo 15. Los números de copias de los cinco transcritos determinados por este análisis cuantitativo resultaron tener 9,6 x 10<sup>3</sup> (0 emparejamientos erróneos), 1,1 x 10<sup>4</sup> (2 emparejamientos erróneos), 7,2 x 10<sup>3</sup> (3 emparejamientos erróneos), 5,6 x 10<sup>3</sup> (4 emparejamientos erróneos) y 6,3 x 10<sup>3</sup> (5 emparejamientos erróneos); este número de copias estaba muy próximo al 8 x 10<sup>3</sup> esperado. En la escala log<sub>10</sub>, la mayor diferencia entre estos cinco números de copias determinados fue de 0,29 log<sub>10</sub>. De este modo, el grupo de sondas lineales parcialmente de doble hebra cuantificó transcritos hasta con cinco mutaciones tan exactamente como el tipo salvaje (0 emparejamientos erróneos). Esto demuestra la tolerancia de las sondas parcialmente de doble hebra a los emparejamientos erróneos y demuestra su utilidad para cuantificar las regiones diana que contienen polimorfismos genéticos.

## REIVINDICACIONES

## 1. Un método para cuantificar ARN en una muestra de ensayo, comprendiendo el método

5 (A) mezclar la muestra de ensayo con los reactivos de amplificación, los reactivos de transcripción inversa y una sonda de ácido nucleico que comprende un primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico, donde

(I)

10 a) el primer ácido oligonucleico tiene 30 - 34 bases (m) de longitud y tiene una homología de 80% o más con un ácido nucleico de interés, y comprende adicionalmente un fluoróforo;

b) el segundo ácido oligonucleico tiene n bases de longitud donde n está relacionado con m de manera que cuando m es de 30 a 34, n es de 8 a 15; y comprende adicionalmente un extintor;

15 c) el primer ácido oligonucleico y, el segundo ácido oligonucleico se **caracterizan porque:**

i) el segundo ácido oligonucleico tiene una homología de 80% o más con el primer ácido oligonucleico, y

20 ii) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí en ausencia del ácido nucleico de interés en condiciones apropiadas para formar un ácido nucleico de doble hebra de manera que la emisión de fluorescencia del fluoróforo anclado al primer ácido oligonucleico cuando el primer ácido oligonucleico está unido al segundo ácido oligonucleico es detectable menos que la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos entre sí, o

(II)

25 a) el primer ácido oligonucleico tiene 30 - 34 bases (m) de longitud y tiene una homología de 80% o más con un ácido nucleico de interés, y comprende un extintor,

b) el segundo ácido oligonucleico tiene n bases de longitud donde n está relacionado con m de manera que cuando m es de 30 a 34, n es de 8 a 15; y comprende un fluoróforo;

30 c) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se **caracterizan porque:**

i) el segundo ácido oligonucleico tiene una homología de 80% o más con primer ácido oligonucleico, y

35 ii) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí en ausencia del ácido nucleico de interés en condiciones apropiadas para formar un ácido nucleico de doble hebra de manera que la emisión fluorescente del fluoróforo anclado al segundo ácido oligonucleico cuando el primer ácido oligonucleico está unido con respecto al segundo ácido oligonucleico es detectable menos que la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos entre sí, para crear una mezcla en un recipiente de reacción,

40 (B) colocar la muestra de ensayo en condiciones permisivas de transcripción inversa, que opcionalmente también pueden ser permisivas de amplificación, de manera que se produce un ADNc,

(C) someter a ciclo térmico la mezcla de ensayo de manera que se amplifique el ADNc, y

45 (D) medir la fluorescencia de la mezcla de ensayo durante la reacción de amplificación como una indicación de la cantidad de ARN de la muestra de ensayo.

2. El método de la reivindicación 1, donde en dicha sonda de ácido nucleico, el primer y el segundo ácidos oligonucleicos comprenden nucleobases adicionales que no son complementarias al ácido nucleico de interés y el primer oligonucleótido, respectivamente, en los extremos 5' y 3'.

50 3. El método de la reivindicación 1, opción (I), donde en dicha sonda de ácido nucleico la razón del segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico es mayor de 1,1 o donde en dicha sonda de ácido nucleico de la opción (II), la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 1,1.

55 4. El método de la reivindicación 1, opción (I), donde en dicha sonda de ácido nucleico la razón del segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico es mayor de 0,1 y menor de 0,9 o donde en dicha sonda de ácido nucleico de la opción (II), la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 0,1 y menor de 0,9.

60 5. El método de la reivindicación 1, opción (I), donde en dicha sonda de ácido nucleico el primer ácido oligonucleico comprende adicionalmente un extintor o donde en dicha sonda de ácido nucleico de la opción (II), el segundo ácido oligonucleico comprende adicionalmente un extintor.

65 6. El método de la reivindicación 5, donde, en la opción (I), en dicha sonda de ácido nucleico la razón del segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico es mayor de 0,1 y menor de 0,9 o donde, en la opción



(II), en dicha sonda de ácido nucleico la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 0,1 y menor de 0,9.

5 7. El método de la reivindicación 5, donde, en la opción (I), en dicha sonda de ácido nucleico la razón del segundo ácido oligonucleico con respecto al primer ácido oligonucleico es mayor de 1,1 o donde, en la opción (II), en dicha sonda de ácido nucleico la razón del primer ácido oligonucleico con respecto al segundo ácido oligonucleico es mayor de 1,1.

10 8. El método de la reivindicación 1, opción I, donde en dicha sonda de ácido nucleico el primer ácido oligonucleico comprende al menos dos fluoróforos para permitir que la fluorescencia generada por el primer ácido oligonucleico que comprende dos fluoróforos cuando está unido a un ácido nucleico de interés sea sustancialmente mayor que la fluorescencia generada cuando solamente está presente un fluoróforo.

15 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1- 8, donde dicho primer ácido oligonucleico se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 5.

10. El método de las reivindicaciones 1 – 8, donde dicho segundo ácido oligonucleico se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 11.

20 11. El uso de una sonda de ácido nucleico que comprende un primer ácido oligonucleico y un segundo ácido oligonucleico, donde

(I)

25 a) el primer ácido oligonucleico tiene 30 - 34 bases (m) de longitud y tiene una homología de 80% o más con un ácido nucleico de interés, y comprende adicionalmente un fluoróforo;

b) el segundo ácido oligonucleico tiene n bases de longitud donde n está relacionado con m de manera que cuando m es de 30 a 34, n es de 8 a 15; y comprende adicionalmente un extintor;

30 c) el primer ácido oligonucleico y, el segundo ácido oligonucleico se **caracterizan porque**:

i) el segundo ácido oligonucleico tiene una homología de 80% o más con el primer ácido oligonucleico, y

35 ii) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí en ausencia del ácido nucleico de interés en condiciones apropiadas para formar un ácido nucleico de doble hebra de manera que la emisión fluorescente del fluoróforo anclado al primer ácido oligonucleico cuando el primer ácido oligonucleico está unido con respecto al segundo ácido oligonucleico es detectable menos que la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos entre sí, o

(II)

40 a) el primer ácido oligonucleico tiene 30 - 34 bases (m) de longitud y tiene una homología de 80% o más con un ácido nucleico de interés, y comprende un extintor,

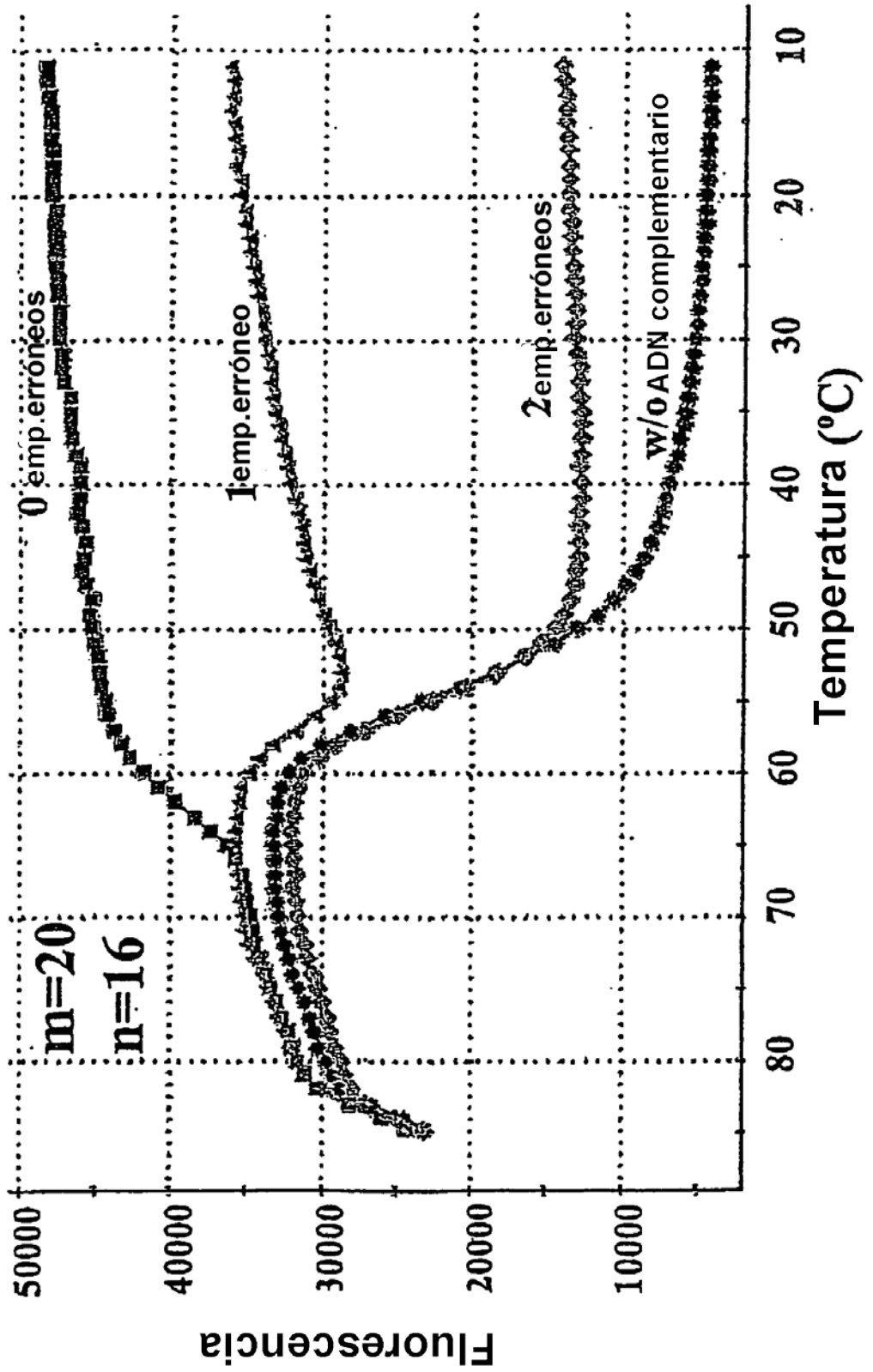
b) el segundo ácido oligonucleico tiene n bases de longitud donde n está relacionado con m de manera que cuando m es de 30 a 34, n es de 8 a 15; y comprende un fluoróforo;

45 c) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se **caracterizan porque**:

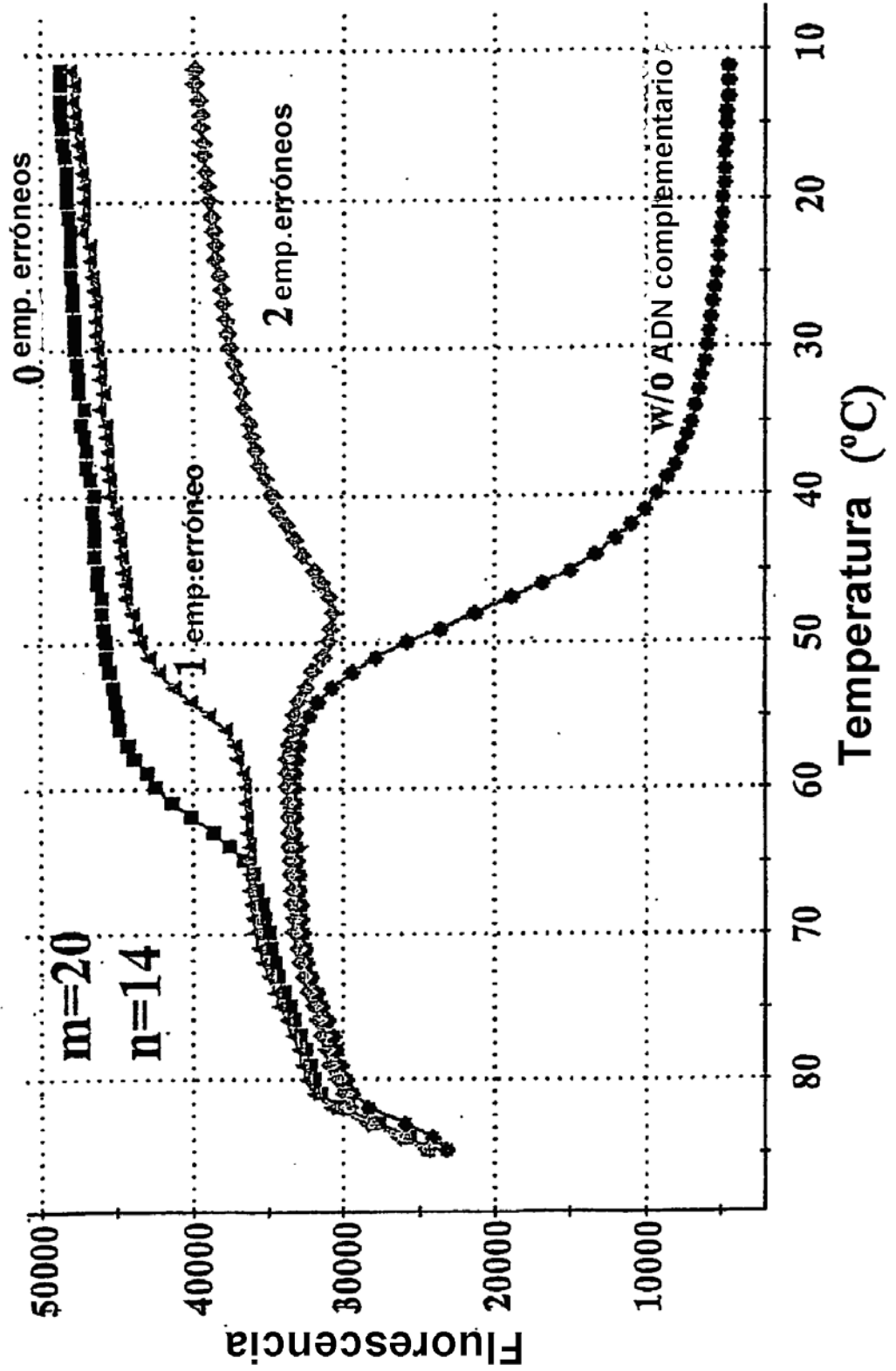
i) el segundo ácido oligonucleico tiene una homología de 80% o más con el primer ácido oligonucleico, y

50 ii) el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico se pueden unir entre sí en ausencia del ácido nucleico de interés en condiciones apropiadas para formar un ácido nucleico de doble hebra de manera que la emisión de fluorescencia del fluoróforo anclado al segundo ácido oligonucleico cuando el primer ácido oligonucleico está unido con respecto al segundo ácido oligonucleico es detectable menos que la emisión del mismo fluoróforo cuando el primer ácido oligonucleico y el segundo ácido oligonucleico no están unidos entre sí, en un método para la reivindicación 1.

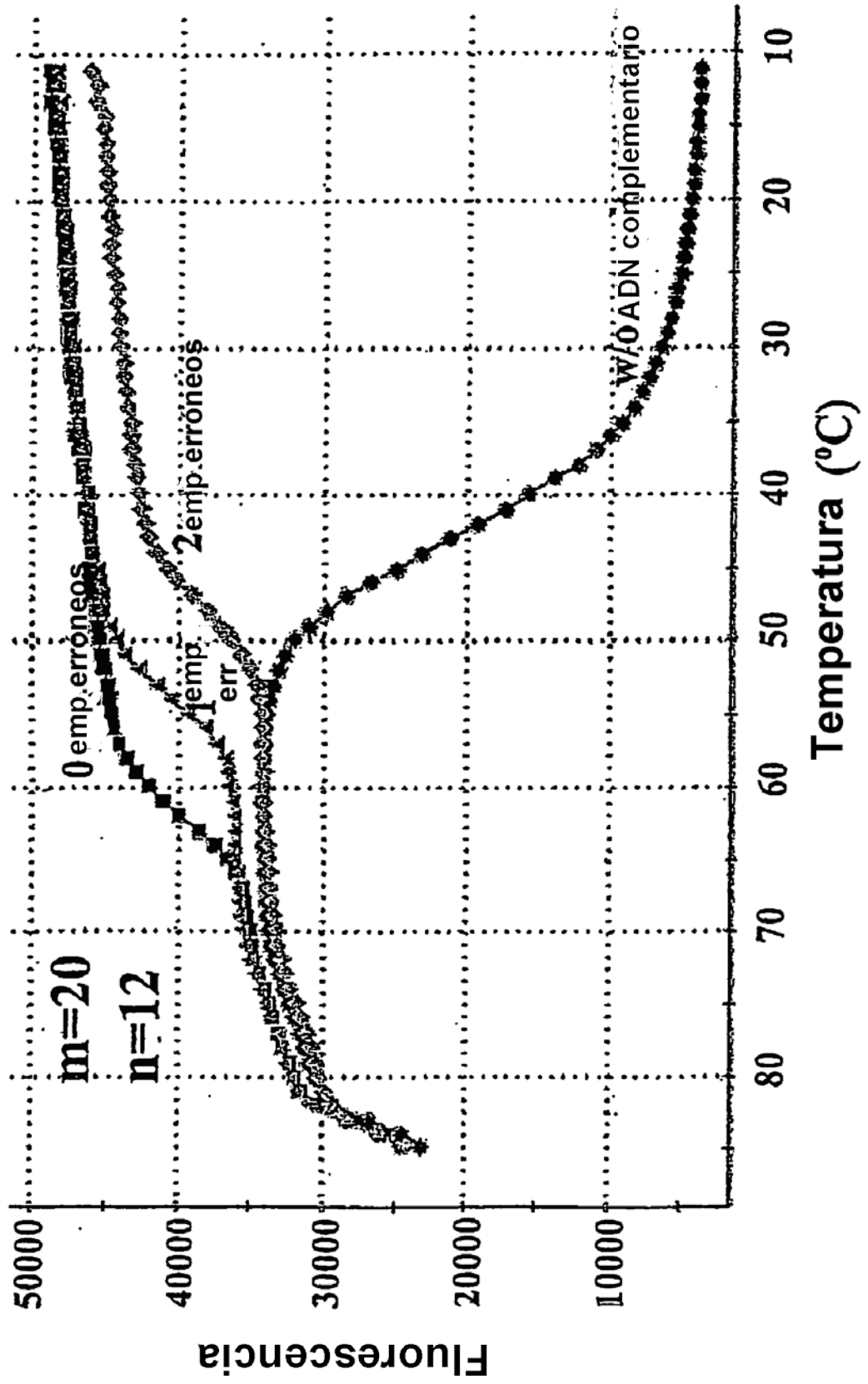
**Fig. 1A: Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamiento Erróneos (comparativo)**



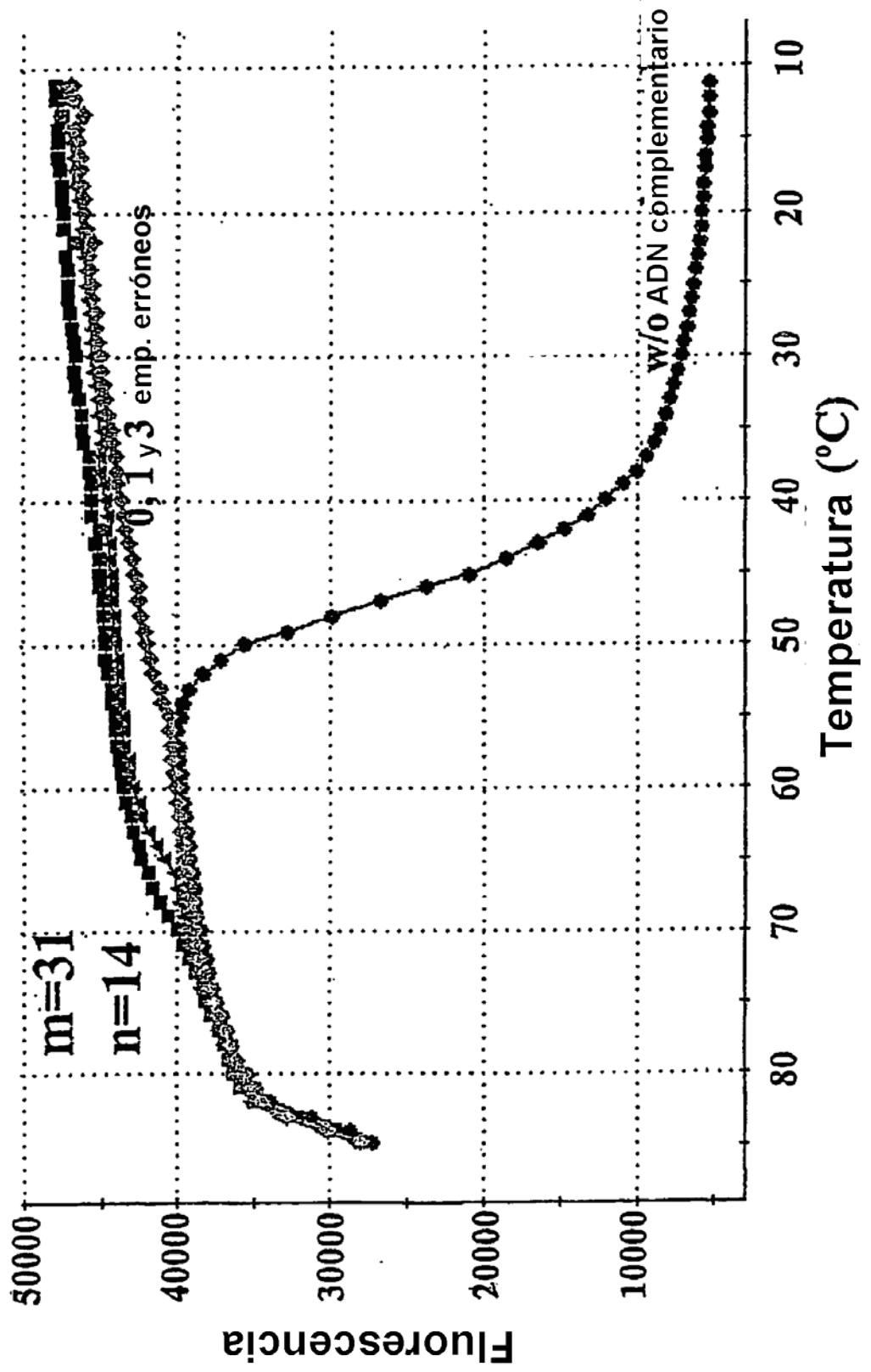
**Fig. 1B: Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamientos Erróneos (comparativo)**



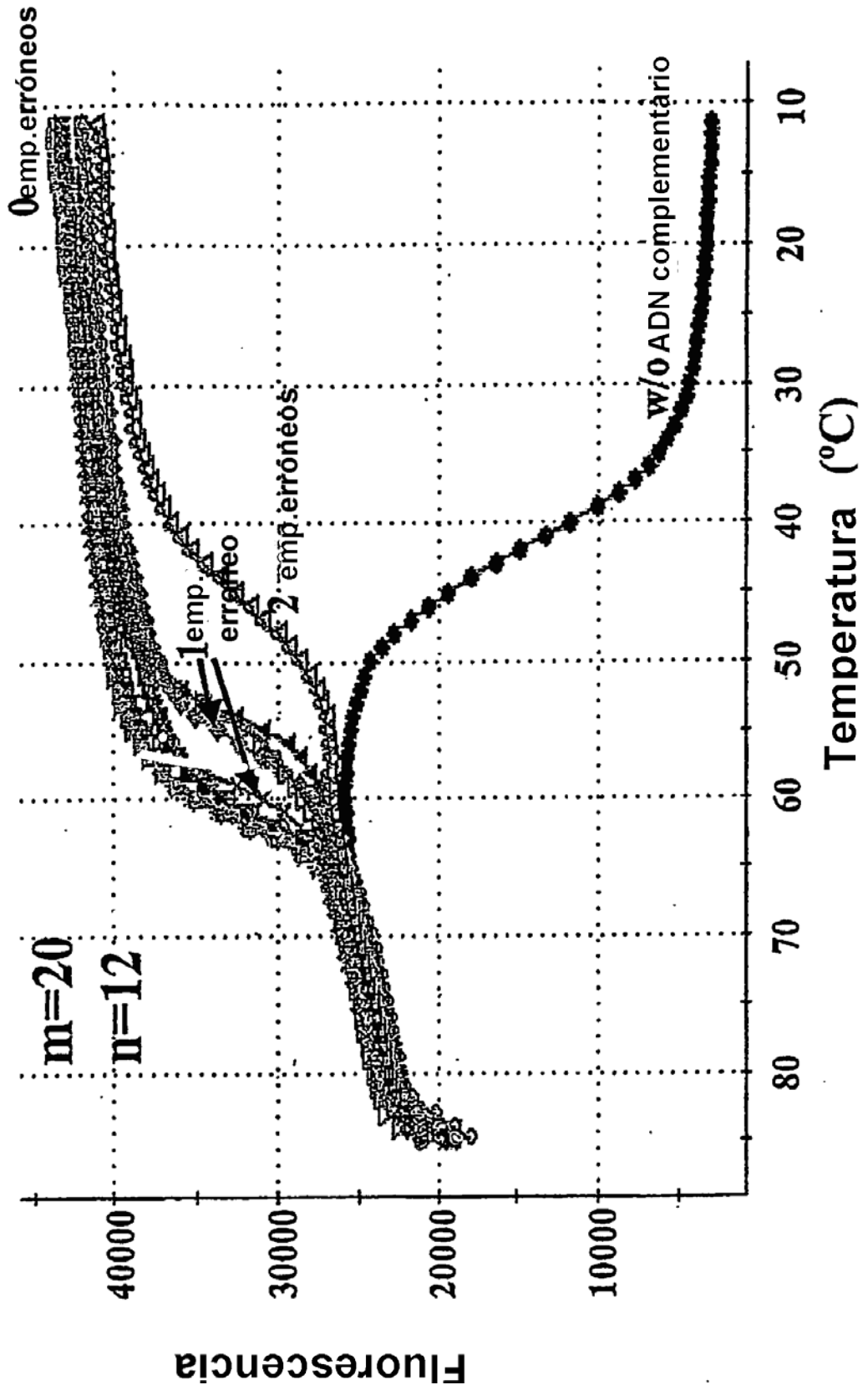
**Fig. 1C.: Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamientos Erróneos (comparativo)**



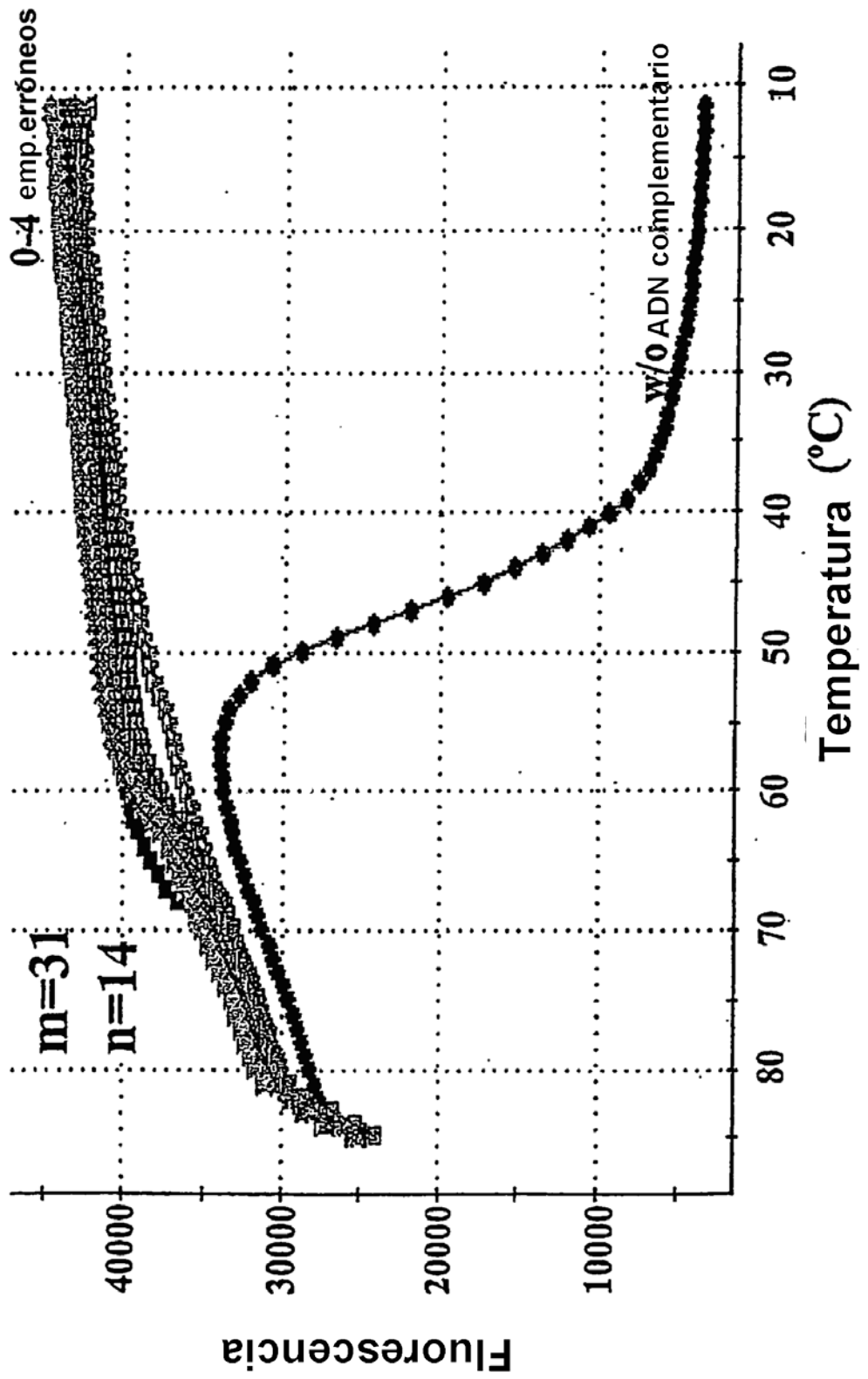
**Fig. 1D: Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamientos Erróneos (de la invención)**



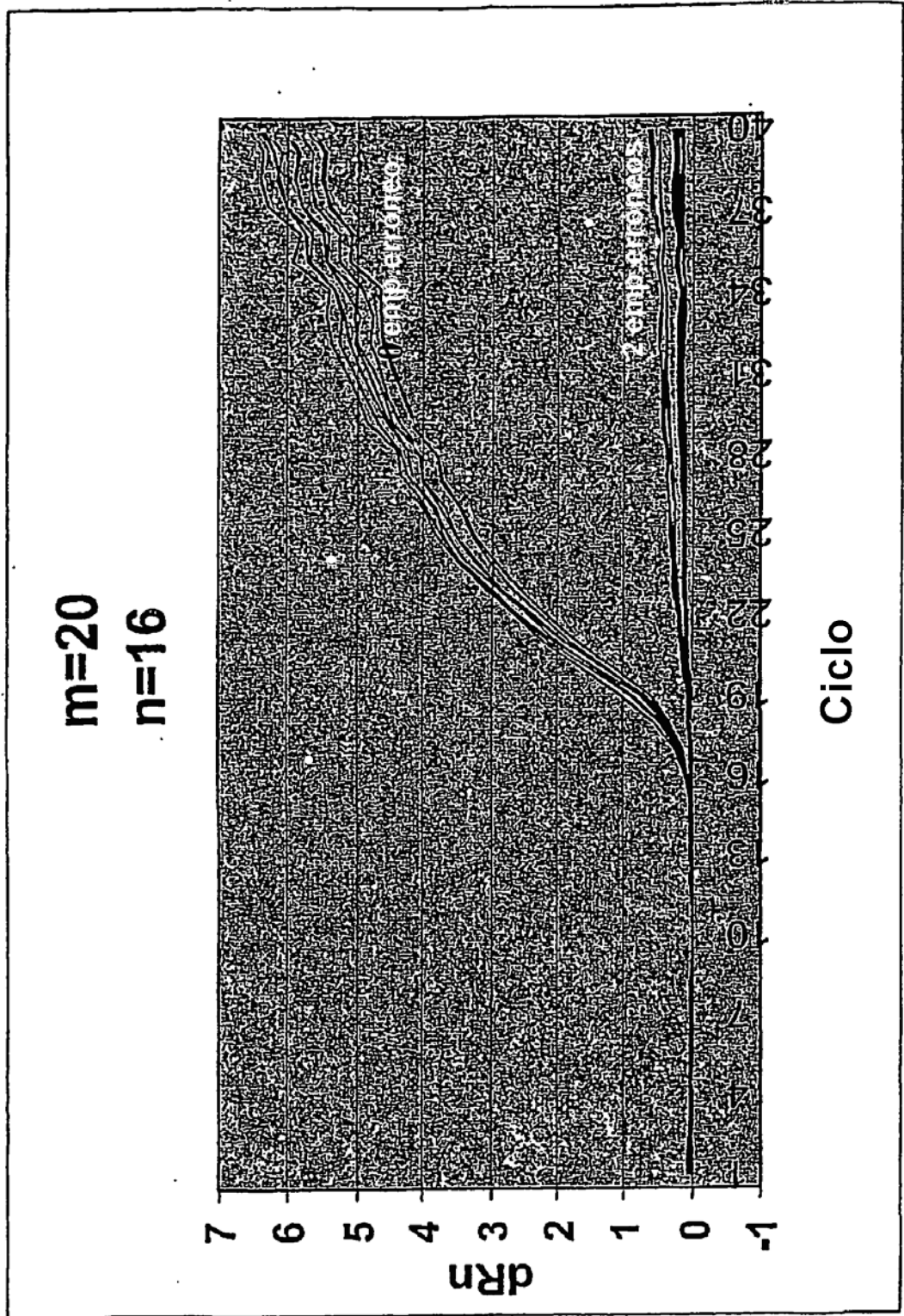
**Fig. 1E: Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamientos Erróneos (de la invención)**



**Fig. 1F : Curvas de Fusión para la Tolerancia a Emparejamientos Erróneos (de la invención)**

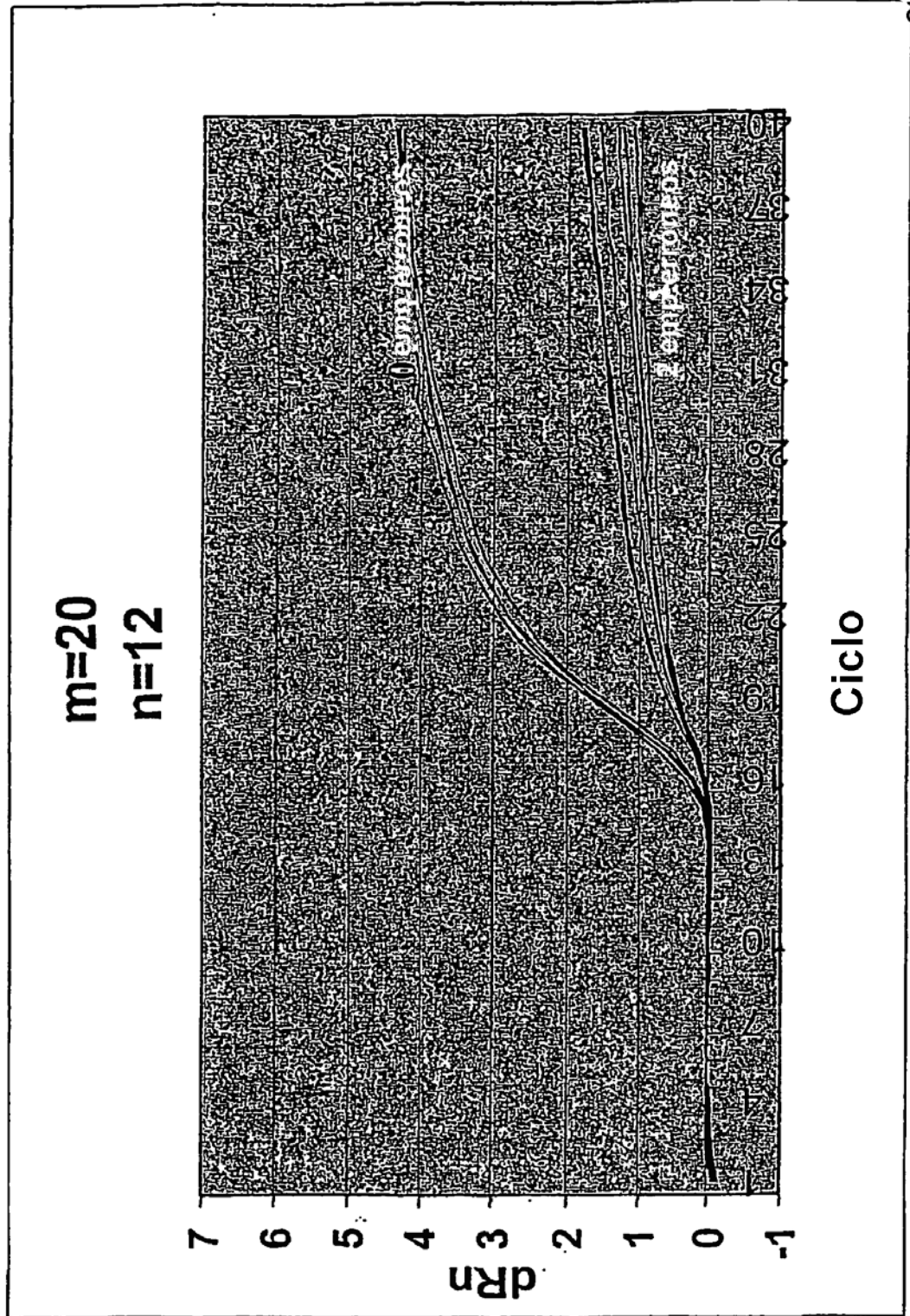


**Fig. 2A: Tolerancia a Emparejamientos Erróneos en RT-PC en  
Tiempo Real (comparativo)**

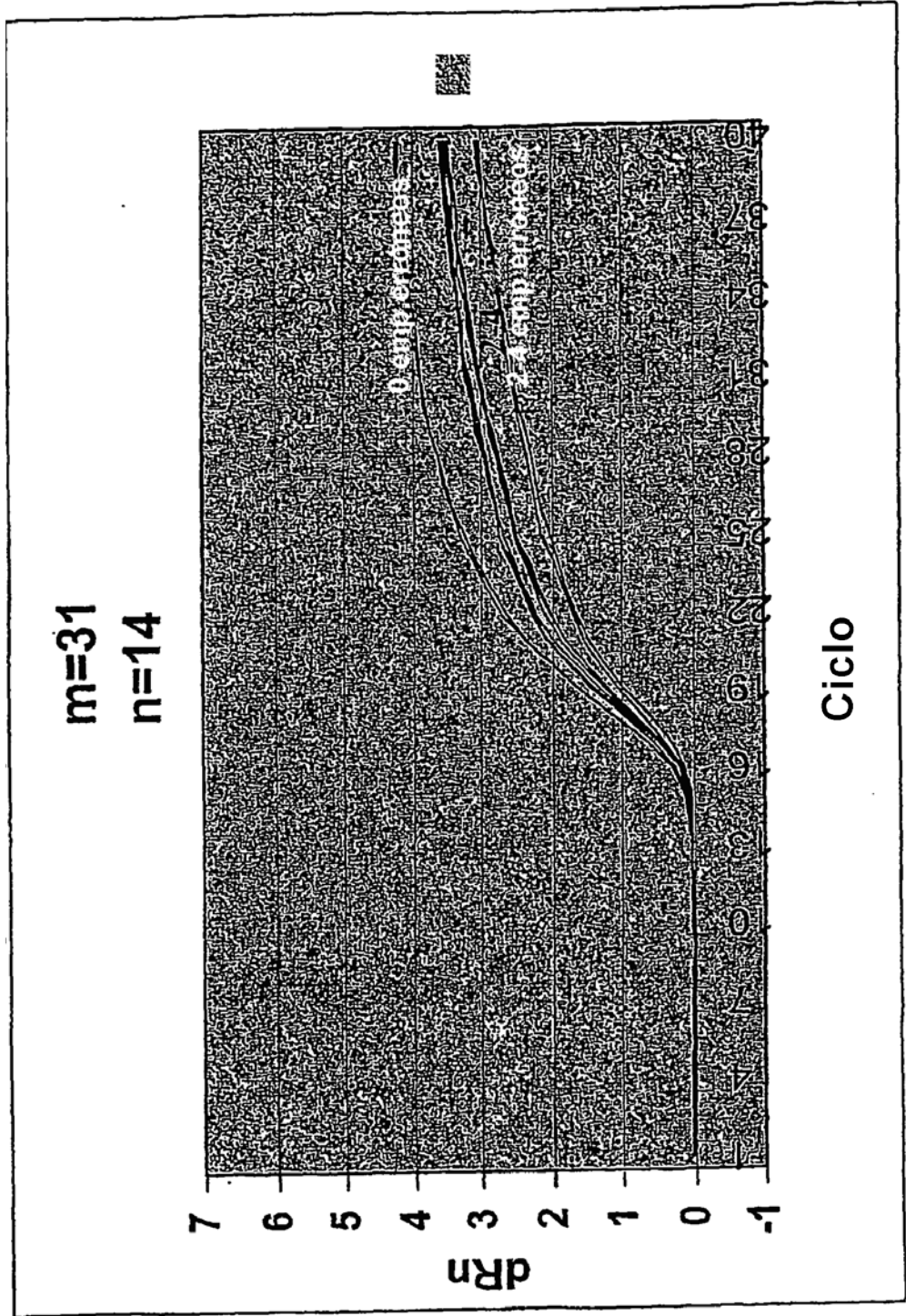




**Fig. 2B: Tolerancia a Emparejamientos Erróneos en RT-PCR  
en Tiempo Real (comparativo)**



**Fig. 2C: Tolerancia a Emparejamientos Erróneos en RT-PCR  
en Tiempo Real (de la invención)**



**Fig. 3A: Gráficos de Amplificación de Transcrito de VIH**  
**(Grupo de Sondas FAM Lineales: lin-41/que-23 para VIH)(comparativo)**

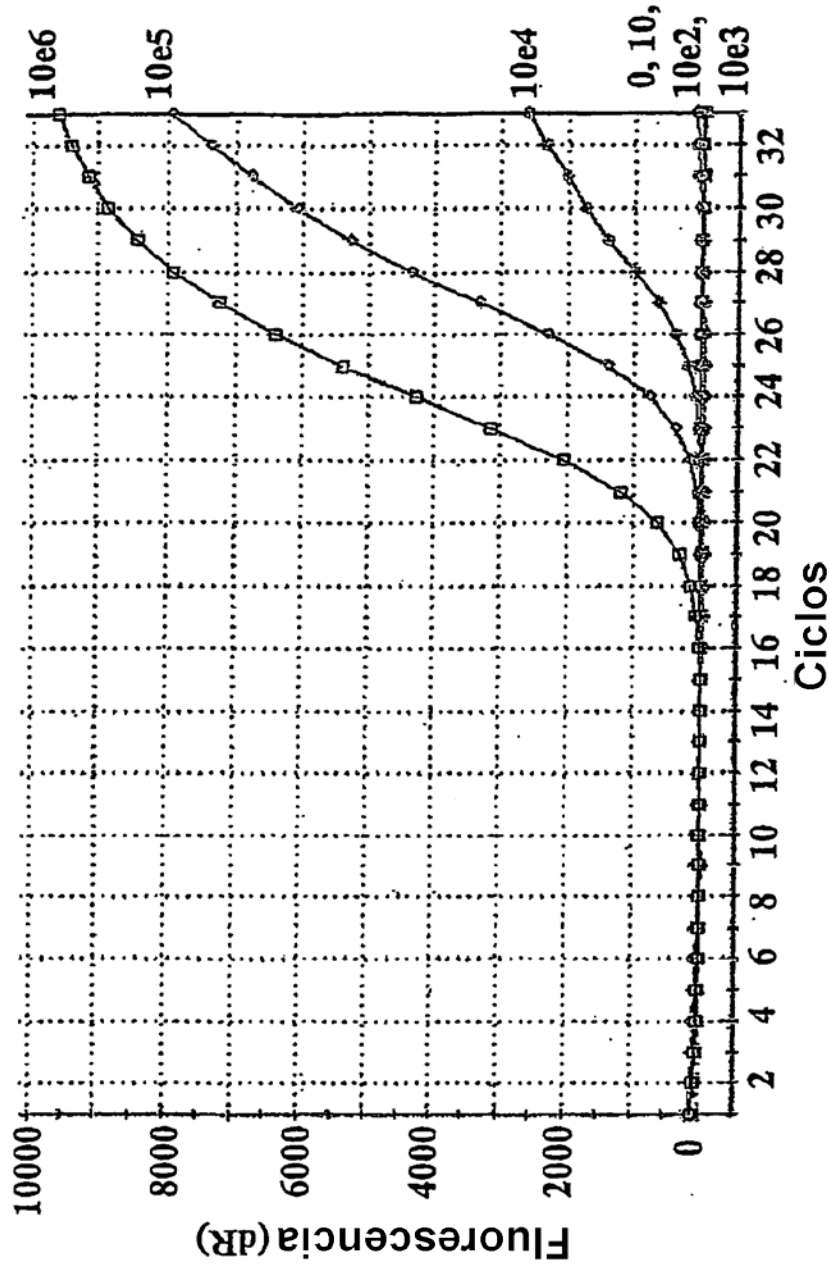


Fig. 3B Gráficos de Amplificación de Transcrito CI (100 copias/Rxn) (Comparativo)

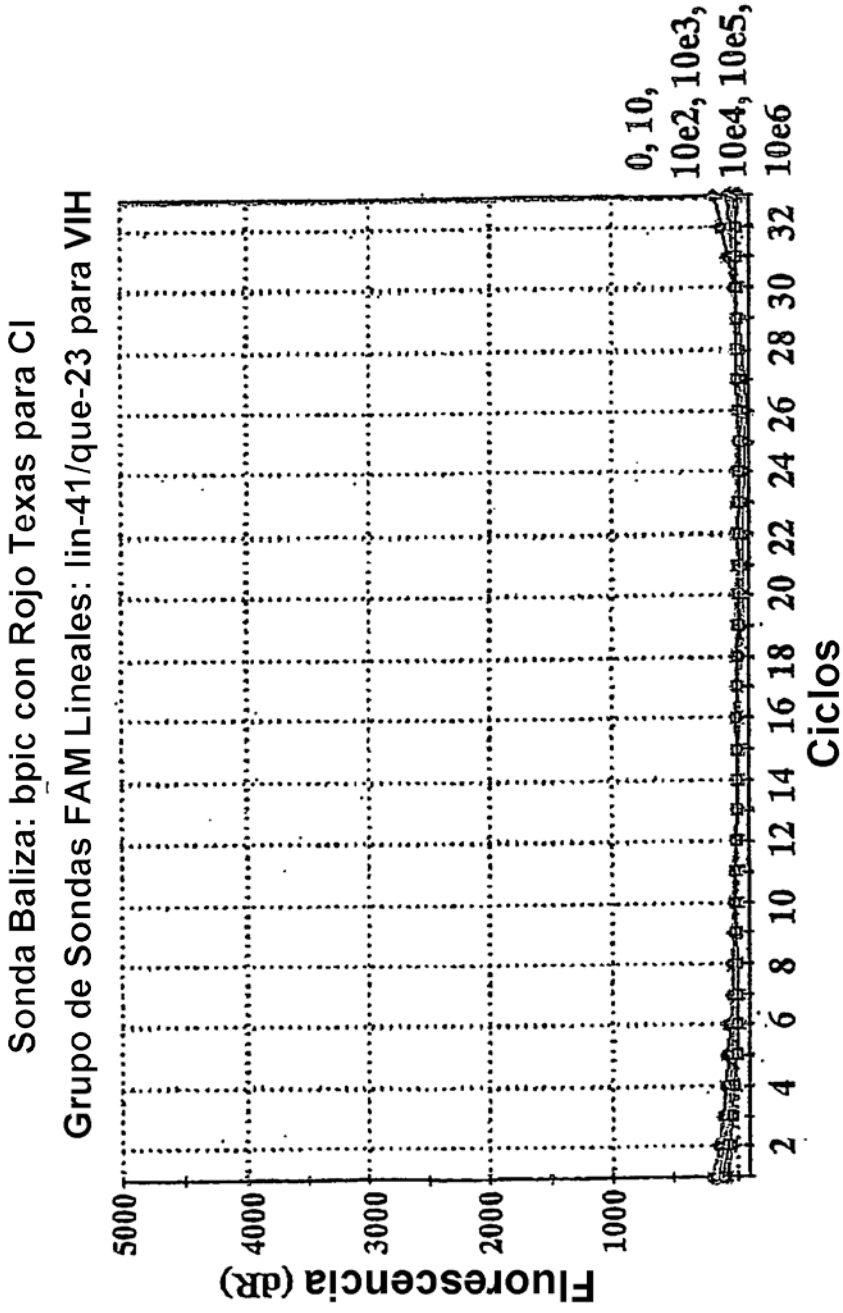


Fig. 4A Gráficos de Amplificación de Transcrito WT de VIH  
 (Grupo de Sondas FAM Lineales: lin-41/que-22 para VIH) (comparativo)

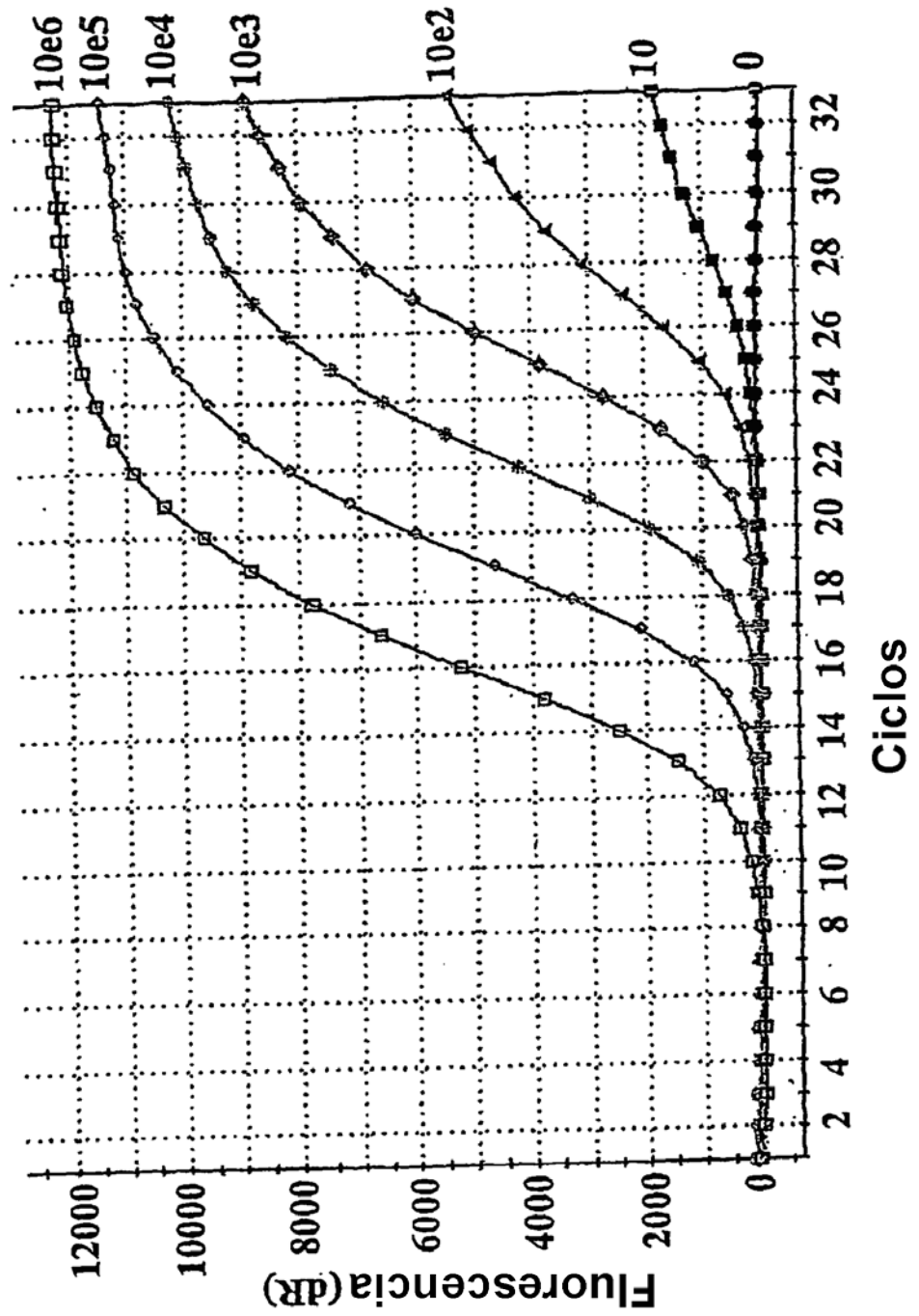
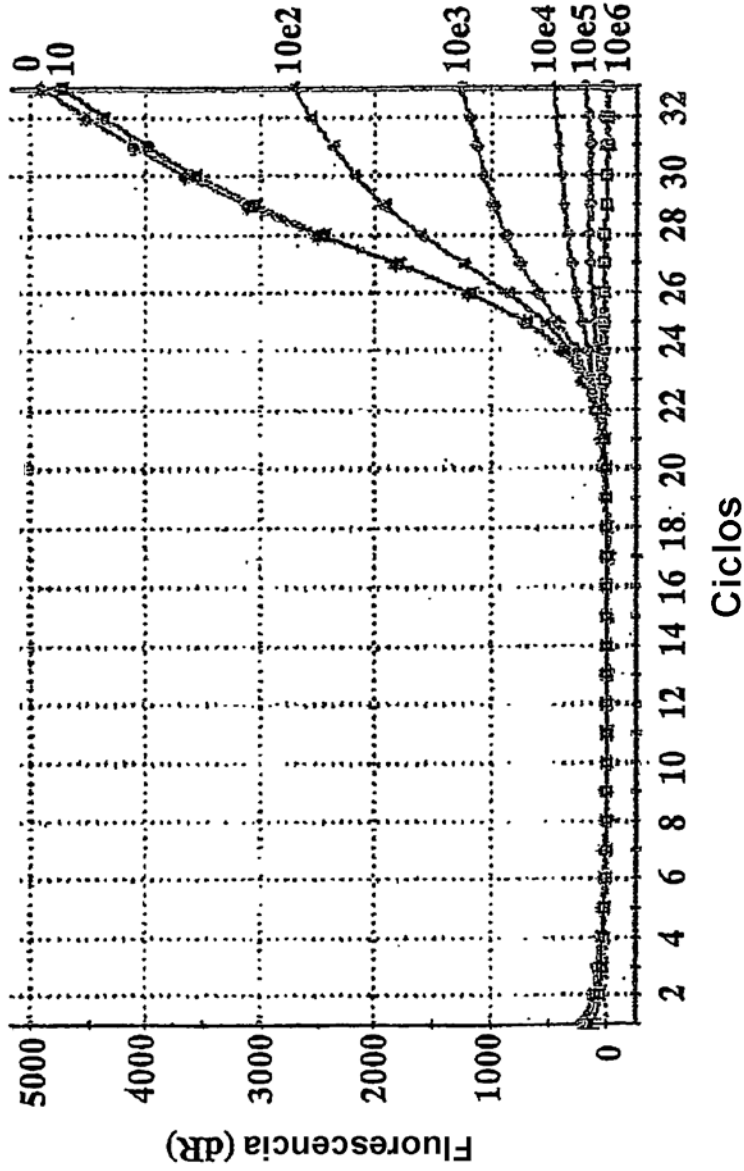


Fig.4B Gráficos de Amplificación de Transcrito CI (100 copias/Rxn) (comparativo)  
Sonda Baliza: pbic-7 con Rojo Texas para CI  
Grupo de Sondas FAM Lineales: lin-41/que-22 para VIH



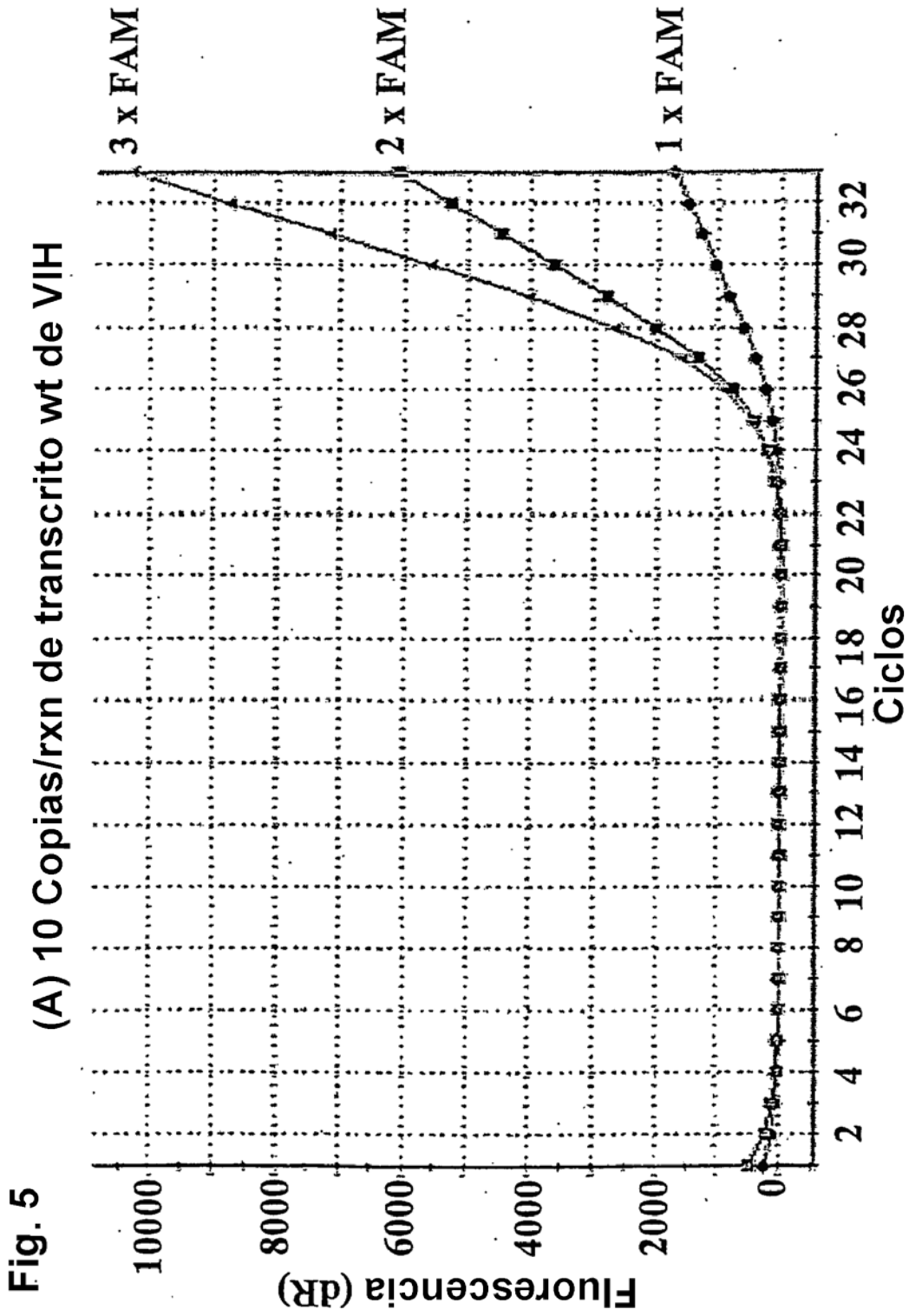


Fig. 5 (B) 10e3 Copias/rxn de transcrito wt de VIH

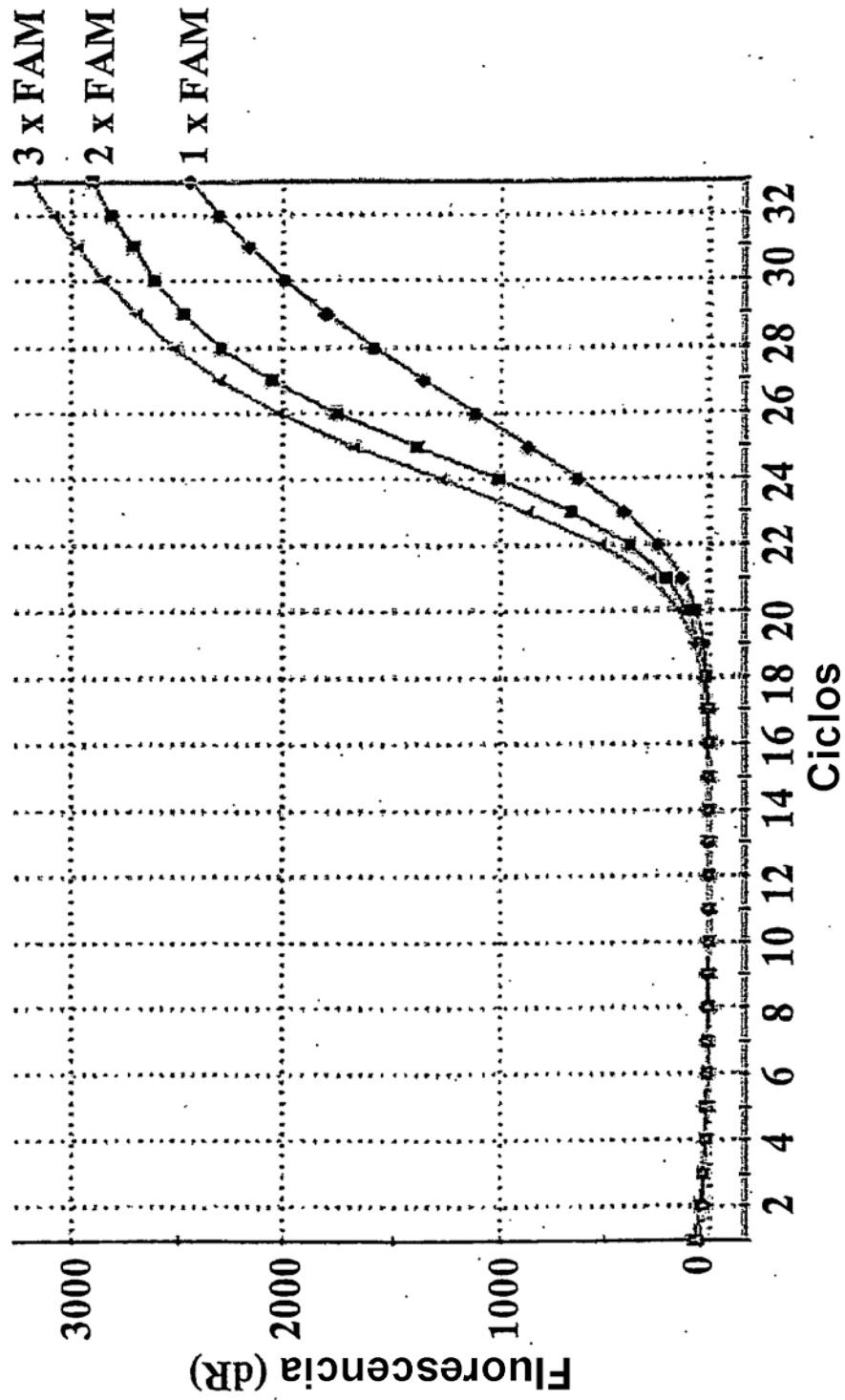




Fig. 5 (C) 10e5 Copias/rxn de transcritto wt de VIH

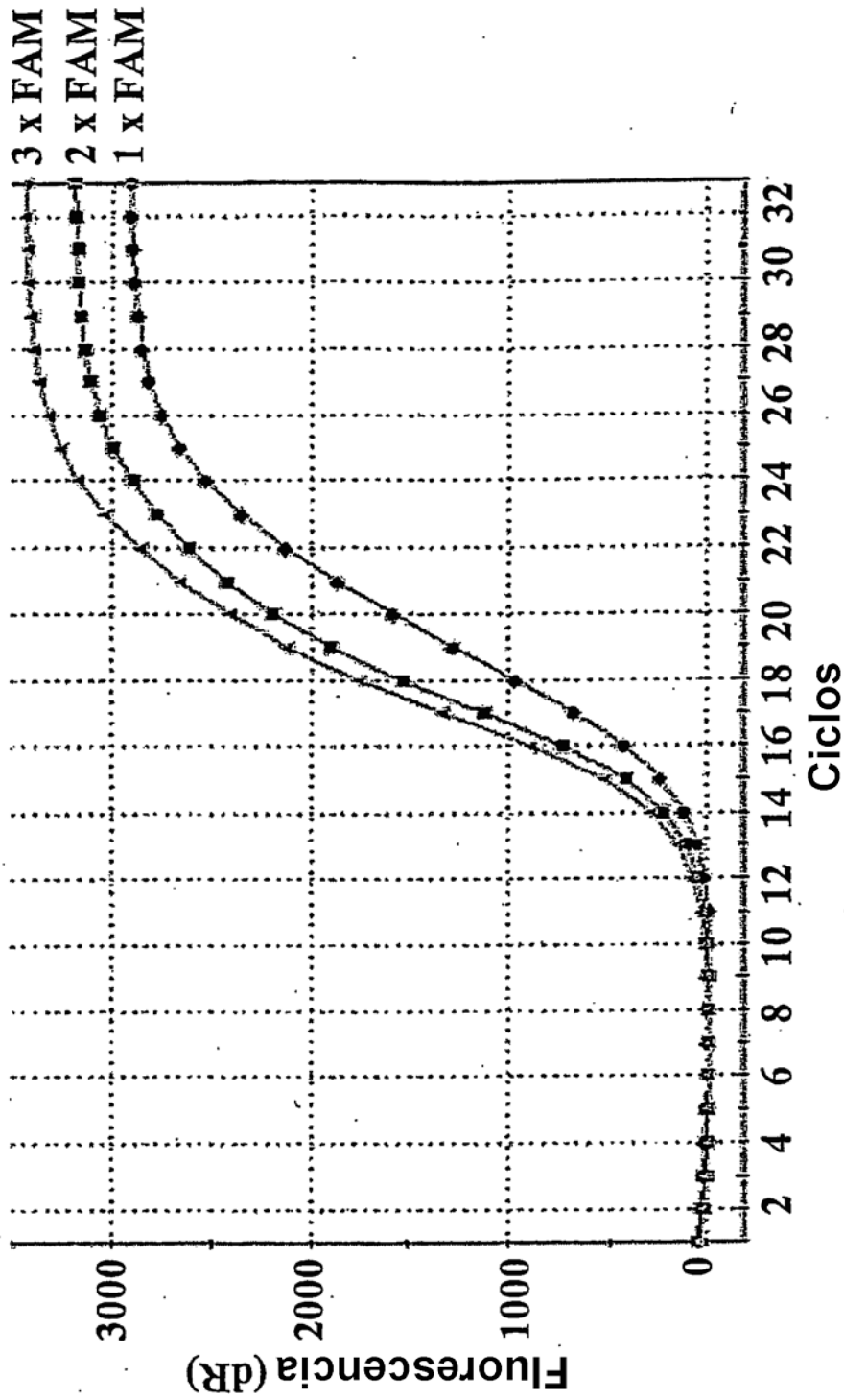


Fig. 5 (D) 10e6 Copias de transcrito wt de VIH

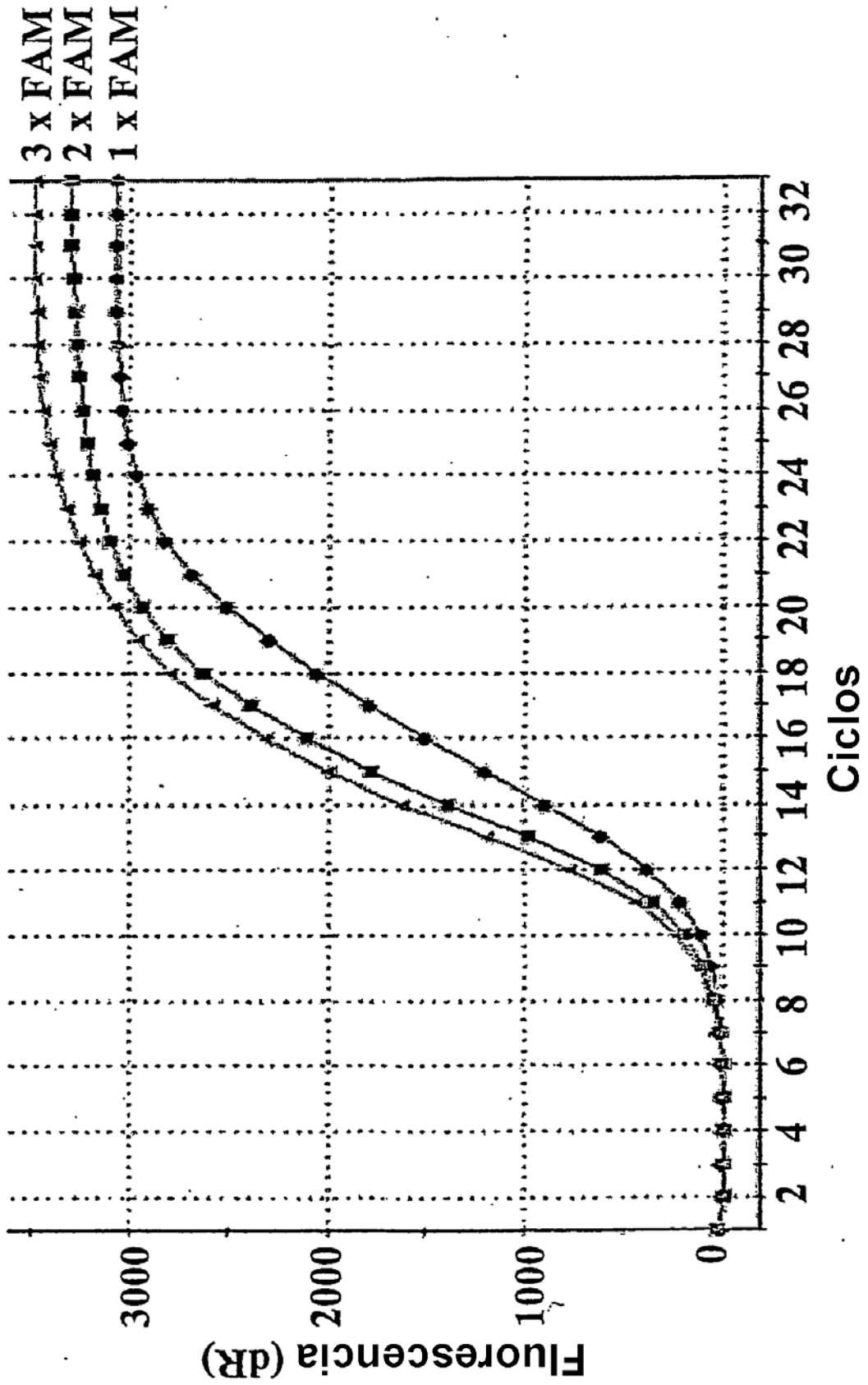


Fig. 6 Gráficos de Amplificación de Transcritos de VIH con Mutaciones (Grupo de Sondas FAM: fam-650/sque-15BH + bhq-5015 para VIH) (comparativo)

