

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 888**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03767736 .6**  
96 Fecha de presentación: **02.12.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1567665**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **Método para reducir los efectos de las variaciones en la secuencia y los efectos de un incremento de la línea de base en un ensayo de hibridación de diagnóstico, ensayo para realizar tal método y sonda para uso en el ensayo**

30 Prioridad:  
**03.12.2002 EP 02080125**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.10.2012**

73 Titular/es:  
**BIOMÉRIEUX BV  
BOSEIND 15  
5281 RM BOXTEL, NL**

72 Inventor/es:  
**VENEMA, Fokke**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 387 888 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

Método para reducir los efectos de las variaciones en la secuencia y los efectos de un incremento de la línea de base en un ensayo de hibridación de diagnóstico, ensayo para realizar tal método y sonda para uso en el ensayo

5 La presente invención se refiere a un método para reducir el efecto de las variaciones en la secuencia en ensayos de hibridación de diagnóstico que utilizan una sonda de ácido nucleico para detectar una sustancia a analizar de ácido nucleico amplificado. La presente invención se refiere también a un método para reducir el efecto del IBL no deseado (aumento de la línea de base, del inglés "Increase of Base Line"), que limita el uso de sondas fluorescentes en ensayos de hibridación de diagnóstico. La invención se refiere además a los ensayos así obtenidos, y a sondas para uso en tales ensayos, los ensayos de diagnóstico y las sondas que emplean al menos uno de estos dos métodos para reducir consecuencias no deseables sobre los resultados de diagnóstico. Muchos ensayos de diagnóstico se basan en la amplificación de una molécula de ácido nucleico o de parte de la misma con la ayuda de cebadores, y la detección del material amplificado por medio de una sonda. Bajo unas condiciones de reacción apropiadas, los cebadores se hibridan con la sustancia a analizar que se va a detectar, e inician la amplificación de la secuencia diana. Esto dará lugar a la generación de amplicones.

15 Entretanto se han desarrollado diversas técnicas de amplificación, como PCR, LCR, NASBA, TMA, RCR, 3SR y SDA, y son bien conocidas por el experto en la técnica. Una información adecuada sobre estas técnicas se puede encontrar en varios documentos:

• PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), descrita en los documentos de patentes US-A-4.683.195, US-A-4.683.202 y US-A-4.800.159, y su derivado RT-PCR (PCR con transcripción inversa), para llevar a cabo la amplificación del ARN, descrita particularmente en el documento EP-B-0.569.272,

• LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa), expuesta en el documento EP-A-0.201.184,

• NASBA (Amplificación Basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos) se describe en el documento WO-A-91/02818, y

• TMA (Amplificación basada en la Transcripción) descrita en el documento de patente US-A-5.399.491,

25 • RCR (Reacción de Reparación en Cadena) expuesta en el documento de solicitud WO-A-90/01069,

• 3SR (Replicación de Secuencia Autoprolongada) bien explicada en el documento de solicitud WO-A-90/06995.

30 Durante o después de la amplificación de la sustancia a analizar o de parte de la misma, se debe detectar la presencia o la cantidad de amplicones generados. Esto se puede realizar con varias técnicas conocidas, tales como la separación de la muestra en un gel con una transferencia posterior e exploración. Esto sólo puede realizarse después de que haya terminado la amplificación.

En un procedimiento homogéneo, la amplificación y la detección se producen sin separar los componentes de la reacción. Los amplicones se detectan durante la amplificación. Por lo tanto, la generación de amplicones se puede controlar en tiempo real y los datos así obtenidos se pueden utilizar para determinar la presencia o ausencia, o la cantidad del amplicón. Un tipo de sonda que es muy útil en tales técnicas homogéneas es la sonda fluorescente.

35 Las sondas fluorescentes son oligonucleótidos monocatenarios que tienen una estructura de horquilla. La porción del bucle contiene la secuencia complementaria al ácido nucleico diana (ADN o ARN). El vástago se forma por la hibridación de la secuencia complementaria del extremo 3' con el extremo 5'. El vástago puede no estar relacionado con la diana y es bicatenario. Un brazo del vástago está marcado con un colorante fluorescente (fluoróforo), mientras que el otro está acoplado a una molécula extintora de la fluorescencia. En el estado de horquilla, la sonda no produce fluorescencia porque la energía del fluoróforo se transfiere a la molécula extintora de la fluorescencia. Cuando la sonda fluorescente se hibrida con la diana, se pierde la estructura de horquilla y el extintor y el fluoróforo se separan. En esta fase la fluorescencia emitida por el fluoróforo se puede detectar y cuantificar. Recientemente el solicitante ha observado durante el desarrollo de ensayos utilizando MBs (del inglés "molecular beacon", sonda fluorescente) para la detección de la diana, que la calidad de las enzimas disponibles comercialmente (por ejemplo, polimerasa de ARN de T7 (T7)) que se utilizan normalmente, durante el proceso de amplificación difiere. Esto llevó a la observación de que diferentes lotes de T7, incluso del mismo proveedor, con la misma actividad específica y actividad de volumen, tenían diferentes niveles de abertura no deseada de las MBs (efecto IBL), si estas MBs consisten en desoxirribonucleótidos naturales. Por lo tanto, aparece una señal fluorescente incluso en ausencia de secuencias dirigidas a la diana de forma específica, en la muestra biológica que se va a someter a ensayo, generando un posible resultado de falso positivo.

55 Si personas cualificadas podrían haber relacionado el efecto IBL con la propia T7, nuestras investigaciones mostraron inesperadamente que no es la propia T7 la que genera este fenómeno, sino que es más probable que sea al menos un contaminante desconocido en la T7, que puede variar de lote a lote. De acuerdo con las publicaciones expuestas en relación con el método para reducir el efecto de las variaciones en la secuencia en ensayos de hibridación de diagnóstico, el experto en la técnica podría haber determinado la utilidad de una MB que consiste sólo

en derivados de 2'-O-metilo para superar el efecto del IBL. El solicitante observó inesperadamente, que es mucho más eficaz introducir menos grupos 2'-O-metilo en la MB, y que la sustitución de todos los desoxirribonucleótidos naturales conduce a MBs no funcionales o menos funcionales.

5 En cuanto al efecto de las variaciones en la secuencia en ensayos de hibridación de diagnóstico, los amplicones generados en la reacción de amplificación se pueden detectar cuantitativa o cualitativamente. En el primer caso, se cuantifica la cantidad de amplicones generados. En un ensayo cualitativo solo se determina la presencia o ausencia de la sustancia a analizar.

10 Las variaciones en la secuencia (polimorfismos) de la sustancia a analizar pueden conducir a una hipocuantificación de la misma. También en el caso de ensayos cualitativos, las variaciones de la secuencia pueden dar como resultado falsos negativos. En general se supone que esto está causado por desemparejamientos entre la sustancia a analizar y los cebadores utilizados para amplificar la sustancia a analizar o por la estructura de la sustancia a analizar, que hace que los cebadores no se unan.

15 Se sabe que existen diversas cepas patógenas polimórficas de virus, como por ejemplo para las sustancias a analizar VIH, CMV, HSV, etc. Estas cepas polimórficas difieren entre sí por lo general en uno o varios nucleótidos. Cuando un cebador difiere de la sustancia a analizar, no se empareja muy bien lo que lleva a una amplificación reducida. Cuando la sustancia a analizar no es lineal sino que tiene una estructura particular, es menos accesible para el cebador, lo que a su vez conduce también a una amplificación reducida.

20 Además, las diferencias en la secuencia entre la secuencia diana amplificada de la sustancia a analizar y la sonda utilizada para la detección, disminuyen adicionalmente la eficacia de la detección. Las sustancias a analizar con polimorfismos se detectan por tanto peor que las sustancias a analizar que se emparejan perfectamente con la secuencia de consenso de la sonda. Sin embargo, la detección se realiza generalmente a temperaturas más bajas que la amplificación, y por lo tanto el efecto negativo de los desemparejamientos entre la sonda y la diana se espera que sea mucho menor que el que está causado por diferencias entre el cebador y la sustancia a analizar.

25 La sonda se puede mejorar para que se corresponda con polimorfismos conocidos. Sin embargo, en el caso de polimorfismos desconocidos esto no es posible. Esto es particularmente un problema, ya que los polimorfismos nuevos y desconocidos se generan continuamente, lo que dificulta una detección o cuantificación fiable especialmente en el caso del VIH.

30 En la investigación que condujo a la invención se encontró que en una reacción de amplificación NASBA de una muestra (clínica) de un virus VIH con un polimorfismo desconocido, no se generaron ninguna señal o solo señales débiles en el sistema de detección de sondas fluorescentes. Sin embargo, se pudieron detectar sorprendentemente amplicones cuando la sonda fluorescente se modificó de tal manera que se incrementó la temperatura de fusión de la sonda con la sustancia a analizar. Esto condujo a la conclusión inesperada de que los amplicones se seguían produciendo en efecto, pero no se detectaban o sólo se detectaban parcialmente.

35 En cuanto al efecto del IBL, el solicitante observó también que este efecto, debido a la abertura no deseada del vástago de las sondas fluorescentes por la acción de contaminante(s) presente(s) dentro del lote de las enzimas, tales como las utilizadas durante la amplificación NASBA (AMV-RT, polimerasa de ARN de T7 y ARNasa H), se puede reducir cuando el vástago de las sondas fluorescentes se modificaba de tal manera que los nucleótidos en el vástago se sustituían parcialmente por derivados de 2'-O-metilo.

40 La modificación de los nucleótidos que constituyen las sondas y especialmente las sondas fluorescentes, es una técnica extendida tal y como se puede determinar por las publicaciones mencionadas a continuación.

45 Por ejemplo, en el documento de solicitud WO-A-00/66604, se describe el uso de nucleótidos L-ribo-LNA en la construcción de oligonucleótidos. Los L-ribo-LNAs se pueden utilizar como un medio para aumentar la afinidad y/o la especificidad de las sondas y también para igualar la afinidad de diferentes oligonucleótidos hacia sus secuencias complementarias. Una forma especial de este LNA en combinación con sondas cortas también podría utilizarse para distinguir entre sondas de ARN y las sondas de ADN. Esto se puede conseguir mediante el reemplazo de nucleósidos seleccionados en el oligonucleótido con L-ribo-LNAs para mejorar los procedimientos de diagnóstico y de biología molecular.

50 La publicación de Majlessi y col. (vol. 26, nº 9, 1998, páginas 2224-2229 (documento XP002241700)) describe sondas lineales que contienen solamente oligonucleótidos 2'-O-metilo. El objetivo de esta publicación se limita a una comparación entre las sondas 2'-O-metilo y sondas normales 2'-desoxi, para mostrar la mejora de la Tm y la cinética de hibridación más rápida de las sondas modificadas. Llegan a la conclusión de que la variación de los valores de Tm entre dúplex emparejados y desemparejados era mucho mayor para las sondas 2'-O-metilo que las sondas 2'-desoxi. Esta afirmación es cierta para toda la longitud de las sondas examinadas (8-26 nucleótidos) y la diferencia en la Tm fue más espectacular cuando las longitudes de las sondas eran 16 bases o menos.

55 Otra publicación de Tsourkas y col. (vol. 30, nº 23, 1 de diciembre de 2002, páginas 5168-5174 (documento XP002241701)) propone disminuir la degradación con nucleasas de las sondas fluorescentes. Para este propósito, protegen las MBs y mejoran la afinidad entre las sondas y el ARN, sustituyendo al mismo tiempo todos los 2'-desoxi-

nucleótidos de una sonda fluorescente, por 2'-O-metil-oligonucleótidos.

En un documento de Brown-Driver y col. (vol. 9, nº 2, abril de 1999 (1999-1904), páginas 145-154 (documento XP009008881)), se propone utilizar oligonucleótidos no codificantes complementarios del ARN de VHC, en lugar de oligonucleótidos no modificados, para inhibir la traducción de VHC. Uno de los oligonucleótidos modificados, que es un buen candidato entre otros, es el 2'-O-metil-oligonucleótido. Tal y como se establece para las dos publicaciones mencionadas, todos los nucleótidos de cada oligonucleótido no codificante modificado están constituidos por 2'-O-metil-nucleótidos. La consecuencia de esta estructura es el aumento de la afinidad y, a continuación la fuerte unión entre la diana y los oligonucleótidos modificados.

En contraste con la técnica anterior mencionado más arriba, la invención muestra que las sondas fluorescentes que incorporan sólo algunos 2'-O-metil-nucleótidos por sonda (entre 6 y 15 de los 26 nucleótidos que se hibridan) es decir, entre 23% y 58% de incorporación) son útiles para la detección de dianas de ARN e incluso más eficaces que los oligonucleótidos que están totalmente sustituidos con 2'-O-metil-oligonucleótidos.

En cuanto al efecto de las variaciones de secuencias en ensayos de hibridación de diagnóstico, los análogos de LNA también son candidatos adecuados para llegar al resultado final de esta invención: las sondas fluorescentes, que están parcialmente modificadas con LNAs, se convierten en una herramienta muy versátil para reducir la dependencia frente a la variación de la secuencia de la diana en ensayos de diagnóstico.

De la misma manera, el efecto del IBL debido a la posible apertura de la estructura de horquilla de las sondas fluorescentes debido a contaminante(s) presente(s) en la mezcla de enzimas de la amplificación, se reduce cuando estas sondas fluorescentes están parcialmente modificadas con 2'-O-metil-nucleótidos. Esto llevó a la conclusión inesperada de que con esta estructura mejorada, las sondas fluorescentes tenían una estabilidad mejorada y no se abrían espontáneamente en presencia de enzimas (contaminantes de la amplificación).

Por consiguiente, el objeto de la presente invención es reducir el efecto del IBL debido a la posible apertura de la estructura de horquilla de las sondas fluorescentes y opcionalmente los efectos de polimorfismos de la secuencia en un ensayo de hibridación, mediante la manipulación de la afinidad entre la sonda y la sustancia a analizar. Esto se consigue de acuerdo con la invención introduciendo en el vástago de la sonda uno o varios 2'-O-metil-nucleótidos y uno o varios nucleótidos no modificados, lo que da como resultado un incremento de la afinidad entre la sustancia a analizar y la sonda.

La invención se refiere por tanto a una sonda fluorescente, en donde el vástago de la sonda comprende uno o varios 2'-O-metil-nucleótidos, y uno o varios nucleótidos no modificados. La invención también se refiere a tal sonda fluorescente en donde el bucle de la sonda comprende uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad, seleccionados entre nucleótidos 2'-O-derivatizados y ácidos nucleicos bloqueados, y uno o varios nucleótidos no modificados.

La sonda fluorescente de la invención se puede utilizar en un ensayo de hibridación de diagnóstico para disminuir el efecto de las variaciones de la secuencia en una sustancia a analizar de ácido nucleico, comprendiendo dicho ensayo las etapas de poner en contacto una serie de cebadores y una muestra que contiene la sustancia a analizar de ácido nucleico, para amplificar la sustancia a analizar y detectar la sustancia a analizar amplificada o su complemento, por medio de la sonda, en donde la sonda comprende uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad, y el ensayo de diagnóstico es para determinar la cantidad de sustancia a analizar presente en la muestra.

La sonda fluorescente de la invención también se puede utilizar en un ensayo de hibridación de diagnóstico para disminuir el efecto de las variaciones de la secuencia en una sustancia a analizar de ácido nucleico, comprendiendo dicho ensayo las etapas de poner en contacto una serie de cebadores y una muestra que contiene la sustancia a analizar de ácido nucleico, para amplificar la sustancia a analizar y detectar la sustancia a analizar amplificada o su complemento por medio de la sonda, en donde la sonda comprende uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad, es decir a una temperatura de hibridación constante, la temperatura de fusión de la sonda con cualquier polimorfismo posible de la sustancia a analizar se incrementa en comparación con la temperatura de fusión de una sonda sin modificar con cualquier polimorfismo de la sustancia a analizar, y el ensayo de diagnóstico es para determinar la presencia de la sustancia a analizar en la muestra.

La invención se refiere a la utilización en un ensayo de hibridación de diagnóstico de la sonda fluorescente para reducir el efecto del IBL, debido a la posible apertura del vástago de las sondas fluorescentes, gracias al menos a un contaminante presente en la mezcla de enzimas para la amplificación, comprendiendo dicho ensayo las etapas de poner en contacto una serie de cebadores y una muestra que contiene la sustancia a analizar de ácido nucleico para amplificar la sustancia a analizar y detectar la sustancia a analizar amplificada o su complemento, por medio de la sonda, en donde el vástago de la sonda comprende:

- uno o varios 2'-O-metil-nucleótidos, y
- uno o varios nucleótidos no modificados.

La invención también se refiere a la utilización en un ensayo de hibridación de diagnóstico, de la sonda para disminuir:

- el efecto de variaciones de la secuencia en una sustancia a analizar de ácido nucleico, y
- el efecto del IBL debido a la posible abertura de la estructura de horquilla de las sondas fluorescentes por medio de enzimas contaminadas,

comprendiendo dicho ensayo las etapas de poner en contacto una serie de cebadores y una muestra que contiene la sustancia a analizar de ácido nucleico para amplificar la sustancia a analizar y detectar la sustancia a analizar amplificada o su complemento por medio de la sonda, en donde el bucle de la sonda comprende:

- uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad, seleccionados a partir de nucleótidos 2'-O-derivatizados y ácidos nucleicos bloqueados, y

- uno o varios nucleótidos no modificados,

y el vástago de la sonda comprende:

- uno o varios 2'-O-metil-nucleótidos, y

- uno o varios nucleótidos no modificados.

En cuanto a la reducción del efecto de las variaciones de la secuencia en un ensayo con ácidos nucleicos, la unión entre una sonda y una diana es un equilibrio entre la diana no unida y la sonda no unida por un lado, y el dúplex entre los dos, por otro lado.

Este equilibrio se describe por la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) del dúplex, que se define en esta memoria como la temperatura a la que el 50% de la sonda está unida con el ácido nucleico diana en un dúplex. Se puede lograr desplazar el equilibrio hacia el dúplex mediante un aumento de la temperatura de fusión. En un ensayo esto conducirá a una cuantificación igual de sustancias a analizar perfectamente emparejadas, una cuantificación mejor (es decir, superior) de las sustancias a analizar que contienen polimorfismos en la secuencia que es complementaria a la sonda y una detección mejorada de cantidades muy pequeñas de sustancias a analizar (polimórficas).

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "sonda" incluye un tramo de nucleótidos que se hibridan con la diana. Preferiblemente, la parte que se hibrida es un tramo de 10-50, más preferentemente 15-35, lo más preferido 15-30 nucleótidos.

La expresión "que incrementa la afinidad" significa que la temperatura de fusión de un dúplex entre una sonda que comprende una modificación que incrementa la afinidad y una sustancia a analizar, se incrementa, en comparación con la temperatura de fusión entre la sustancia a analizar y la sonda no modificada.

Los nucleótidos o los análogos de nucleótidos en el bucle que tienen una modificación que incrementa la afinidad de una sonda que los contiene, frente a dianas de ADN o ARN, se seleccionan entre el grupo que consiste en nucleótidos 2'-O-derivatizados y ácidos nucleicos bloqueados (LNAs). En el caso de nucleótidos 2'-O-derivatizados se prefiere un 2'-O-metil-nucleótido.

La sonda de acuerdo con la invención es una sonda denominada fluorescente (MB, del inglés "Molecular Beacon"). Estas sondas reconocen sus dianas con mayor especificidad que las sondas lineales y se pueden diferenciar fácilmente las dianas que difieren una de otra por un solo nucleótido. Mediante la introducción de uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad, en el bucle de la sonda fluorescente, la sensibilidad hacia polimorfismos se reduce debido a que se incrementa la afinidad de la sonda hacia la sustancia a analizar polimórfica y se obtienen resultados más precisos en el ensayo. Así, la sonda fluorescente modificada se convierte en una herramienta muy versátil para reducir la dependencia frente a la variación de la secuencia de la diana en un ensayo homogéneo.

Con respecto al efecto del IBL, la expresión "sonda fluorescente" significa un tramo de nucleótidos que pertenecen a la secuencia del extremo 3' de la sonda que se hibrida con la secuencia complementaria del extremo 5' de la sonda. Preferiblemente, la parte que se hibrida es un tramo de 4-15, más preferiblemente 5-10, lo más preferido 6-8 nucleótidos.

Los nucleótidos modificados se utilizan para preparar una sonda quimérica en la que solo se sustituye un número de nucleótidos por un nucleótido modificado.

La cantidad de modificaciones que es mínimamente necesaria para neutralizar los desemparejamientos depende de la cantidad de diferencias entre la secuencia de consenso de una sustancia a analizar y la secuencia de la sustancia a analizar que se va a detectar. En general, se puede afirmar que la cantidad de modificaciones debe ser tal que la temperatura de fusión del dúplex entre la sonda y la sustancia a analizar que se va a detectar, debe estar por encima de la temperatura de detección, es decir, la temperatura a la cual se realiza la detección.

La cantidad de nucleótidos modificados en una sonda también depende del tipo de modificación utilizada. El aumento de la  $T_f$  (la temperatura de fusión de la sonda con su diana) después de la introducción de un solo nucleótido LNA en la sonda es mucho mayor, en comparación con el efecto de un solo 2'-O-metil-nucleótido. En los Ejemplos se muestra, por ejemplo, que la introducción de dos nucleótidos LNA en la sonda aumentaba la  $T_f$  en 15°C, mientras que eran necesarios doce 2'-O-metil-nucleótidos para obtener el mismo incremento en la  $T_f$ .

Las sustancias a analizar que se van a detectar, tales como VIH, pueden contener los llamados "puntos calientes" que son propensos a mutaciones, lo que conduce por tanto a polimorfismos. Cuando la posición de esos puntos calientes u otras posiciones de los desemparejamiento de la sustancia a analizar y la sonda, son conocidas, tal como en el caso de material aislado conocido, se prefiere disponer los nucleótidos o los análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad alrededor de la posición del polimorfismo, preferiblemente en posiciones conservadas.

La presente invención se refiere además a un ensayo de hibridación que emplea la sonda fluorescente para detectar una sustancia a analizar de ácido nucleico, en donde la sonda comprende uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad y uno o varios nucleótidos no modificados. Los nucleótidos modificados y/o los análogos de los mismos utilizados en la sonda son tal y como se han definido anteriormente.

Los ensayos de hibridación de la invención pueden ser de cualquier tipo en el cual se utiliza una sonda de ácido nucleico para detectar una sustancia a analizar de ácido nucleico. Tales ensayos se pueden basar en la detección de sustancias a analizar amplificadas, como en los ensayos que se basan en PCR, TMA o NASBA. Sin embargo, la sonda también se puede utilizar en matrices. La invención se puede utilizar tanto en ensayos de diagnóstico cuantitativos como cualitativos en los que los polimorfismos de la secuencia de la diana influyen en la fiabilidad del ensayo.

Los ensayos de diagnóstico que se benefician de la invención son, por ejemplo ensayos para la detección de virus, bacterias y otros biomarcadores, tales como por ejemplo VIH, VHB, VHC, VHS, CMV, virus Ébola, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Bordetella*, RSV, MRSA, VHS, TNF- $\alpha$ , ER- $\alpha$ , siempre y cuando estos ensayos de diagnóstico se caractericen de tal manera que hagan uso de la hibridación entre la sustancia a analizar de interés y el oligonucleótido modificado.

En esta solicitud, los términos "sustancia a analizar", "amplicón" y "diana" o "secuencia diana" se pueden utilizar indistintamente.

La sustancia a analizar es la molécula original de ácido nucleico que se va a detectar. La secuencia diana es la parte de la sustancia a analizar que se amplifica por medio de los cebadores. La amplificación conduce a la formación de amplicones, que son las moléculas de ácido nucleico que se detectan físicamente mediante hibridación con la sonda. La secuencia de los amplicones es la misma o complementaria a la secuencia diana dentro de la sustancia a analizar.

La invención se describirá ahora con los ejemplos y los dibujos que siguen y que no pretenden limitar la invención de ninguna manera. A continuación, la invención se ilustra adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos:

- Figura 1: Representación esquemática de un sonda fluorescente que permite la detección de bacterias *Legionella*, de acuerdo con el estado de la técnica, denominada en lo sucesivo como Legionella.

- Figura 2: Representación esquemática de una sonda fluorescente mejorada de acuerdo con la presente invención, que permite tanto la detección de la propia bacteria *Legionella* como disminuye el efecto del IBL, denominada en lo sucesivo Leg-met1.

- Figura 3: Representación esquemática de un sonda fluorescente que permite la detección de bacterias *Mycoplasma*, de acuerdo con el estado de la técnica, denominada en lo sucesivo Mycoplasma.

- Figura 4: Representación esquemática de una primera realización de sonda fluorescente mejorada de acuerdo con la presente invención que permite tanto la detección de la propia bacteria *Mycoplasma* como disminuye el efecto del IBL, denominada en lo sucesivo Myco-met.

- Figura 5: Representación esquemática de un sonda fluorescente que permite la detección de bacterias *Chlamydia*, de acuerdo con el estado de la técnica, denominada en lo sucesivo Chlamydia.

- Figura 6: Representación esquemática de un sonda fluorescente mejorada de acuerdo con la presente invención que permite tanto la detección de la propia bacteria *Chlamydia* como disminuye el efecto del IBL, denominada en lo sucesivo Chlam-met.

- Figura 7: Representación esquemática de un sonda fluorescente que permite la detección de bacterias *Enterococci* de tipo silvestre, de acuerdo con el estado de la técnica, denominada en lo sucesivo WT Entero.

- Figura 8: Representación esquemática de una sonda fluorescente mejorada de acuerdo con la presente invención

que permite tanto la detección de la propia bacteria *Enterococci* de tipo silvestre como disminuye el efecto del IBL, denominada en lo sucesivo, WT Entero-met.

5 • Figura 9: Representación esquemática de un sonda fluorescible que permite la detección del VIH, de acuerdo con el estado de la técnica, que no incorpora 2'-O-metil-nucleótidos ni en el vástago ni en el bucle, denominada en lo sucesivo MB de Referencia.

• Figuras 10-19: Representación esquemática de una serie de sondas fluorescibles que permiten la detección del VIH, de acuerdo con el estado de la técnica, denominadas en lo sucesivo como MB 1 a MB 10. Cada sonda fluorescible tiene un vástago diferente que contiene derivados de 2'-O-metilo.

• Figura 20: Gráfico de barras que representa el efecto de diferentes lotes de la enzima T7 sobre el efecto del IBL.

10 • Figura 21: Gráfico de barras que representa el efecto de la estructura óptima del vástago sobre el efecto del IBL que varía, de diferentes lotes de enzimas, y que representa el estudio comparativo del efecto del IBL en relación con la estructura de varias sondas fluorescibles utilizadas en un ensayo, es decir, sondas fluorescibles sin modificar por un lado y sondas fluorescibles modificadas por otro lado.

En las figuras 20 y 21, las sondas fluorescibles modificadas incorporan 2'-O-metil-nucleótidos en el vástago.

15 En las figuras 1-8 y 10-19, los nucleótidos modificados están representados por la letra correspondiente, principalmente G para guanidina o A para adenina, en negrita, cursiva y de forma subrayada.

**Descripción general de detalles experimentales de los ejemplos:**

Los ejemplos descritos a continuación utilizan las condiciones y los métodos mencionados a continuación, a menos que se indique lo contrario en los ejemplos.

20 En los experimentos que utilizan material de ARN amplificado, este material se obtuvo mediante la amplificación de un molde de ARN (lisado vírico), que se extrajo y se amplificó empleando condiciones convencionales de aislamiento y amplificación NASBA.

En cada ejemplo, las condiciones de la reacción se mantuvieron idénticas, excepto la variación en el tipo de sonda (sonda fluorescible) que se utilizó.

25 Como un sistema modelo para determinar la reactividad mejorada del subtipo, se empleó un conjunto de material lisado vírico bien caracterizado que representaba la mayor parte de los diferentes subtipos de VIH-1.

30 Si una reacción de amplificación se utiliza para generar un resultado cuantitativo, la diana se ha coamplificado utilizando una cantidad conocida de calibrador interno, que se ha añadido antes del aislamiento. Este calibrador interno se detecta utilizando otra sonda fluorescible con un color diferente. A partir de las curvas de amplificación en tiempo real y utilizando un programa especialmente desarrollado, es posible determinar con precisión la cantidad de material presente. Las temperaturas de fusión (Tf) entre la diana y las sondas fluorescibles se determinaron midiendo la intensidad de la fluorescencia de las mezclas como una función de la temperatura creciente. A partir de estas curvas de fusión, se puede determinar la Tf. Si la diana en exceso es amplicón (ARN), la Tf se denomina Tf del ARN del bucle. Si la diana es un exceso de ADN sintético, la Tf se denomina Tf del ADN del bucle. Esta última se ha  
35 determinado utilizando una hebra de ADN sintético, que es complementaria a la sonda fluorescible. En esta secuencia se han introducido dos Cs opuestas a las Inosinas. En la diana de ARN (amplicón) estas posiciones contienen dos Ts.

**Ejemplo 1**

Efecto de la sustitución de nucleótidos en una sonda con derivados 2'-O-metílicos sobre la Tf del dúplex

40 Las secuencias de la parte que se hibrida de tres MBs nuevas y una MB de referencia se muestran en la Tabla 1. Asimismo, los valores de las Tf de las diferentes sondas fluorescibles en las que se ha medido el ADN sintético y el material amplificado (ARN) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre	Tf del ADN del bucle	Tf del ARN del bucle	Posición																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Ref.	58,6	48,6	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	I	G	C	T	G	C	A	G	A	I	T	G	G	G	A
Me-1	54,7	53,8	A	T	C	<b>A</b>	<b>A</b>	T	G	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	I	G	C	T	G	C	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	I	T	G	G	G	A
Me-2	58,7	62,1	A	T	C	<b>A</b>	<b>A</b>	T	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	I	<b>G</b>	C	T	<b>G</b>	C	A	<b>G</b>	<b>A</b>	I	T	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	A
Me-7	59,4	>65	A	T	C	<b>A</b>	<b>A</b>	T	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	I	<b>G</b>	C	T	<b>G</b>	C	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	I	T	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	A

**A, G** = 2'-O-Me-nucleótidos de A y G, respectivamente

Como puede verse a partir de los datos de la Tabla 1, la introducción de derivados de 2'-O-metilo conduce a una afinidad incrementada (Tf del ARN del bucle mayor) entre el ARN diana y el bucle de la sonda fluorescente. Como era de esperar, este incremento es menos pronunciado para el complejo ADN-sonda fluorescente, puesto que se conoce que los derivados de 2'-O-metilo se unen más fuertemente con las dianas de ARN que con las de ADN.

5 **Ejemplo 2**

Efecto de la sustitución de nucleótidos en una sonda con LNAs sobre la Tf del dúplex

10 En la Tabla 2, se muestran las secuencias que se hibridan de dos MBs nuevas junto con la MB de referencia. Las nuevas MB contienen, respectivamente, dos y tres componentes esenciales de LNAs. También se han medido los valores de la Tf para el ADN complementario y para el material amplificado (ARN) y los resultados se muestran en la tabla. En esta tabla se puede observar que los nucleótidos LNAs aumentan la Tf de ambos complejos de ADN y ARN. También se puede observar que el efecto sobre la Tf por la modificación es mucho mayor, en comparación con los 2'-O-metil-nucleótidos.

Tabla 2

Nombre	Tf del ADN del bucle	Tf del ARN del bucle	Posición																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Ref.	45,8	57,6	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	C	A	G	A	A	T	G	G	G	A
LNA 1	47,1	62,8	<u>a</u>	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	A	G	C	<u>t</u>	G	C	A	G	A	A	T	G	G	G	A
LNA 2	57,5	>65	<u>a</u>	T	C	A	A	T	G	A	G	G	<u>a</u>	A	G	C	<u>t</u>	G	C	A	G	A	A	T	G	G	G	A

a nucleótido LNA

15 **Ejemplo 3**

Detección de diferente material aislado a partir de VIH-1 con las sondas fluorescentes modificadas

20 El material aislado a partir de VIH-1 que se ha seleccionado para actuar como un sistema modelo para investigar el efecto de cinco polimorfismos de la secuencia de ARN diana, se muestra en la Tabla 3. Este material estaba disponible como lisados víricos con una concentración conocida y se ha utilizado en una amplificación NASBA con las sondas fluorescentes del ejemplo 1 y 2.

Tabla 3

Nombre	Posición																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Sonda fluorescente de Ref.	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	I	G	C	T	G	C	A	G	A	I	T	G	G	G	A
Subtipo A	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	<u>A</u>	G	C	T	G	C	A	G	A	<u>A</u>	T	G	G	G	A
Subtipo G1	A	T	<u>T</u>	A	A	T	G	A	<u>A</u>	G	A	<u>A</u>	G	C	T	G	C	A	G	A	<u>G</u>	T	G	G	G	A
Subtipo N	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	<u>A</u>	G	C	<u>A</u>	G	C	A	G	A	<u>C</u>	T	G	G	G	A
Subtipo O1	A	T	C	A	A	T	G	A	<u>T</u>	G	A	<u>A</u>	G	C	<u>A</u>	G	C	A	G	A	<u>T</u>	T	G	G	G	A
Subtipo O3	A	T	C	A	A	T	G	A	G	G	A	<u>A</u>	G	C	<u>G</u>	G	C	A	G	A	<u>T</u>	T	G	G	G	A

25 Los resultados de la cuantificación que se obtuvieron para las muestras que contienen una cantidad igual de diana por subtipo, con tres de estas sondas fluorescentes en comparación con nuestra sonda fluorescente de referencia, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

subtipo	MB de Ref.	LNA2	Me-2	Me-7
A	6,5	6,5	6,5	6,5
G	4,7	5,9	6,4	6,6
N	4,3	4,6	5,2	5,3
O1	3,3	4,9	5,4	5,9
O3	4,9	5,8	6,3	6,2

Puesto que el subtipo A se ajusta perfectamente con las cuatro sondas fluorescentes, todos los datos de la cuantificación están normalizados basándose en este subtipo. Los otros subtipos se han seleccionado porque



muestran una variación de secuencia con la región que se une al bucle de la sonda fluorescente (véase Tabla 3). Como se puede observar, las cuantificaciones más elevadas para los cinco subtipos se han observado con el derivado de la sonda fluorescente Me-7.

- 5 Para investigar la relación entre la mejor cuantificación y el valor de la Tf del ARN del bucle (°C) de las diferentes sondas fluorescentes, estas últimas se determinaron para los dúplex entre los derivados de la sonda fluorescente y los amplicones NASBA. Esto dio los resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5: valores de Tf del ARN del bucle (°C) para el material amplificado (ARN) con varias MBs

subtipo	MB de Ref.	LNA2	Me-2	Me-7
A	48	65	62	65
G	45	52	58	65
N	42	55	53	60
O1	27	44	44	53
O3	40	52	54	60

Como se puede observar en las Tablas 4 y 5, existe una clara correlación entre una Tf más elevada del ARN del bucle (entre el amplicón y la sonda fluorescente) y una cuantificación más elevada.

#### 10 Ejemplo 4

##### Efecto de la estructura del vástago sobre la reducción de IBL

- Se comparó una serie de MBs que tenían una secuencia que se hibrida idéntica frente a una diana de VIH. La diferencia entre las MBs era la secuencia del vástago, y el contenido y el lugar de los derivados de 2'-O-metilo en el vástago. Las estructuras investigadas se representan en las Figuras 10-19. La Figura 9 muestra la sonda fluorescente que se utiliza como referencia y que no contiene derivados de 2'-O-metilo.

- 20 Todas las MBs en el experimento descrito a continuación se sometieron a unas condiciones convencionales de amplificación NASBA, en ausencia de diana que se podía detectar con estas MBs (no se producen reacciones con molde). La señal del fluoróforo presente en la MB se midió como una función del tiempo. A partir de estos datos se obtiene el efecto del IBL como el aumento de la señal durante un período de tiempo de 60 minutos. El porcentaje de IBL es el incremento comparado con la señal de partida.

Tabla 6

Número de MB	Porcentaje de IBL
MB de referencia	7%
MB 1	6%
MB 2	5%
MB 3	3%
MB 4	9%
MB 5	5%
MB 6	4%
MB 7	5%
MB 8	1,5%
MB 9	0,5%
MB 10	10%

- 25 Partiendo de esta tabla se puede concluir que MB 4 y MB 10, que contienen tramos continuos de 2'-O-metoxinucleótidos en cualquiera de los extremos 3' o 5' de la MB, no funcionan de manera óptima. También se puede observar a partir de estos datos que el diseño de un vástago con un efecto del IBL bajo, fue inesperadamente bajo para MB 8 y MB 9.

#### Ejemplo 5

##### Efecto de diferentes lotes de la enzima T7 sobre el efecto del IBL

- 30 Una MB que se había diseñado para Enterovirus (figura 7) se comparó con una MB que contenía la misma secuencia hibridante, pero la estructura del vástago se basaba en la MB 8 (véase la figura 17) del ejemplo anterior. La MB modificada que se había diseñado para Enterovirus se representa en la Figura 8.

Las dos MBs se estudiaron en el experimento descrito a continuación. Se sometieron a unas condiciones convencionales de amplificación NASBA, en ausencia de diana que se podía detectar con estas MBs (no se producen reacciones con molde). Las condiciones de reacción se mantuvieron idénticas para ambas MBs y las variaciones que se estudiaron eran:

- 35 1) el efecto de la introducción del nuevo vástago en la sonda y

2) el efecto de tres lotes de la enzima T7 en la reacción NASBA.

5 Los tres lotes se obtuvieron a partir del mismo fabricante y con la misma actividad específica. Eran diferentes en el efecto del IBL observado (normal, intermedio, malo, en términos de efecto del IBL (malo por haber una gran cantidad de aberturas no deseadas de la MB)). La señal del fluoróforo presente en la MB se midió como una función del tiempo. A partir de estos datos el efecto del IBL se obtiene como el incremento de la señal durante un período de tiempo de 120 minutos. El porcentaje de IBL es el incremento en comparación con la señal de partida.

10 En la Figura 20 se puede observar que para todas las MBs que contienen desoxinucleótidos normales, la llamada "WT Entero", la abertura no deseada de las sondas fluorescentes produce un aumento espectacular del efecto del IBL que surge entre el uso de un intermediario y el uso de lotes malos de T7. Sin embargo, las MBs modificadas que contienen 2'-O-metoxi en el vástago (figura 8), no muestran casi ninguna influencia sobre la calidad de los lotes de T7. Esto demuestra claramente que es la calidad de T7 (por ejemplo, podría estar presente al menos un contaminante de la T7) la que determina el IBL y no la propia T7.

### Ejemplo 6

#### Efecto de una estructura óptima del vástago sobre el efecto variante de IBL de lotes diferentes de enzimas

15 Una segunda serie de MBs que se habían diseñado para diferentes dianas (*Legionella* (Figura 1), *Chlamydia* (Figura 3), *Mycoplasma* (Figura 5)) se compararon con las MBs que contenían la misma secuencia hibridante, pero la estructura del vástago se basaba en la MB 8 (véase la figura 17) del ejemplo anterior (respectivamente, *Legionella* (Figura 2) y *Chlamydia* (Figura 6)). Para la diana de *Mycoplasma* esto no fue posible, por lo que se hizo una pequeña desviación en la estructura del vástago en comparación con la MB 8 y se obtuvieron sondas fluorescentes modificadas específicas para esta diana (véase Figura 4).

20 Las MBs se estudiaron en parejas (por diana) en el experimento descrito a continuación. Se sometieron a condiciones convencionales de amplificación NASBA, en ausencia de diana que pudiera detectar con estas MBs (no se producen reacciones con molde). Las condiciones de la reacción se mantuvieron idénticas en cada grupo de MBs y la variación que se estudió era la introducción del nuevo vástago en la sonda y la segunda variación fue el uso de dos lotes de la enzima T7 en la reacción NASBA. El primer lote (referido como T7) se sabía que era bueno, y el segundo lote (del mismo fabricante y con la misma actividad específica) era conocido por generar más aberturas no deseadas de las sondas fluorescentes, produciendo un aumento espectacular del efecto del IBL. La señal del fluoróforo presente en la MB se midió como una función del tiempo. A partir de estos datos, el efecto del IBL se obtiene como el incremento de la señal durante un período de tiempo de 60 minutos. El porcentaje de IBL es el incremento en comparación con la señal de partida.

25 En la Figura 21, se puede observar que para todas las MBs que contienen desoxinucleótidos normales, las T7 malas daban como resultado un mayor efecto del IBL no deseado. Sin embargo, las MBs modificadas que contenían 2'-O-metoxi en el vástago, no mostraron casi ninguna influencia sobre la calidad de la T7. En otras palabras, el uso de derivados metoxi en la estructura del vástago vuelve la MB menos vulnerable a la calidad enzima.

35

## REIVINDICACIONES

1. Sonda fluorescible, en donde el vástago de la sonda comprende:
  - uno o varios 2'-O-metil-nucleótidos, y
  - uno o varios nucleótidos no modificados.
- 5 2. Sonda fluorescible de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el bucle de la sonda comprende:
  - uno o varios nucleótidos y/o análogos de nucleótidos que tienen una modificación que incrementa la afinidad seleccionados a partir de nucleótidos 2'-O-derivatizados y ácidos nucleicos bloqueados, y
  - uno o varios nucleótidos no modificados.
- 10 3. Sonda fluorescible de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el nucleótido 2'-O-derivatizado es un 2'-O-metil-nucleótido.
4. Sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde cada par de bases que constituyen el vástago no contienen más de un 2'-O-metil-nucleótido.
5. Sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos un par de bases que constituyen el vástago no contiene 2'-O-metil-nucleótido.
- 15 6. Sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde un par de bases que constituye el vástago no contiene 2'-O-metil-nucleótido.
7. Sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde cada hebra que constituye el vástago contiene al menos un 2'-O-metil-nucleótido.
- 20 8. Uso de una sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en un ensayo de hibridación de diagnóstico.
9. Ensayo de hibridación de diagnóstico, que comprende las etapas de poner en contacto una serie de cebadores y una muestra que contiene la sustancia a analizar de ácido nucleico, para amplificar la sustancia a analizar y detectar la sustancia a analizar amplificada o su complemento, por medio de una sonda fluorescible, caracterizado porque la sonda fluorescible es una sonda de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 25 10. Ensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el ensayo de diagnóstico es para determinar la cantidad de sustancia a analizar en la muestra.
11. Ensayo de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde el ensayo de diagnóstico es para determinar la presencia de la sustancia a analizar en la muestra.
- 30 12. Ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el ensayo de diagnóstico es un ensayo homogéneo.
13. Ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el ensayo de diagnóstico es un ensayo heterogéneo.
- 35 14. Kit para realizar un ensayo de amplificación de diagnóstico, que comprende los cebadores, polimerasa(s) y reactivos adecuados para realizar la amplificación de una sustancia a analizar que se va a diagnosticar y una sonda fluorescible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

1/5

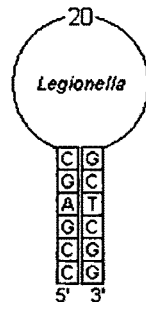


Fig. 1

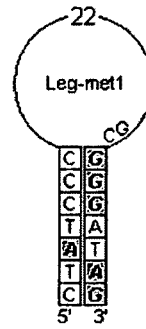


Fig. 2

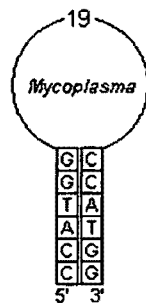


Fig. 3

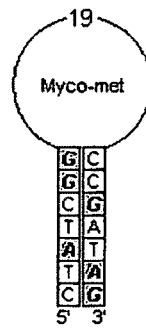


Fig. 4

215

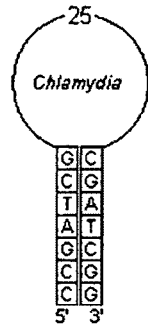


Fig. 5

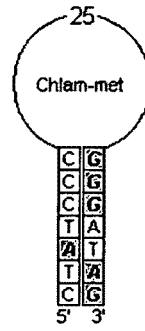


Fig. 6

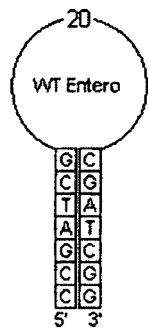


Fig. 7

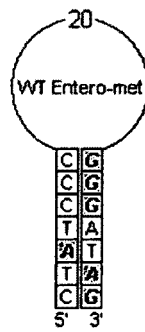


Fig. 8

3/5

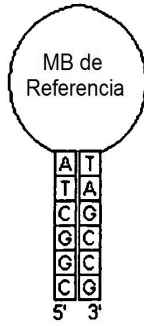


Fig. 9

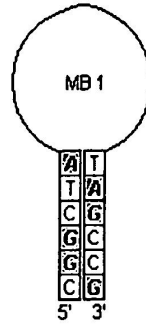


Fig. 10

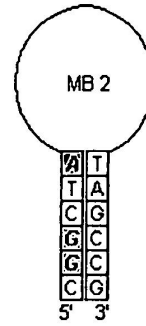


Fig. 11

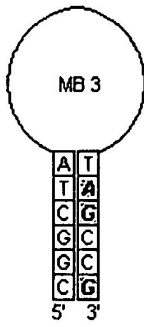


Fig. 12

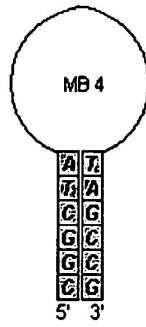


Fig. 13

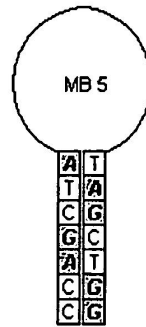


Fig. 14

4 / 5

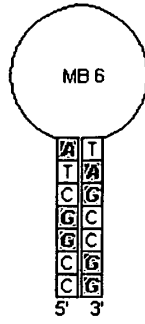


Fig. 15

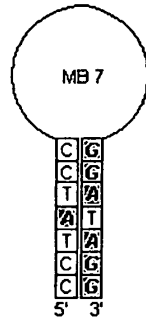


Fig. 16

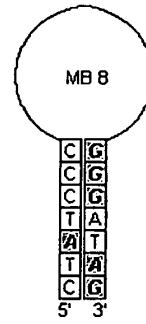


Fig. 17

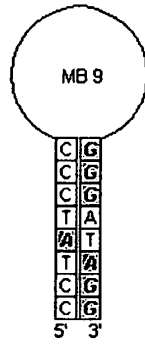


Fig. 18

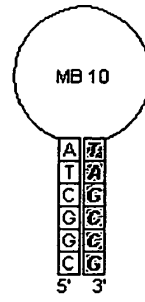


Fig. 19

5/5

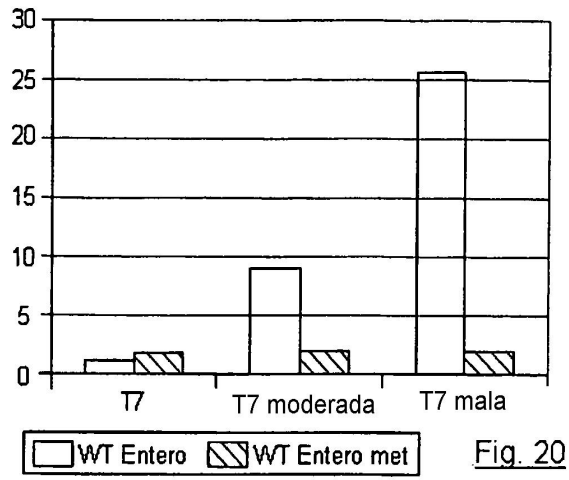


Fig. 20

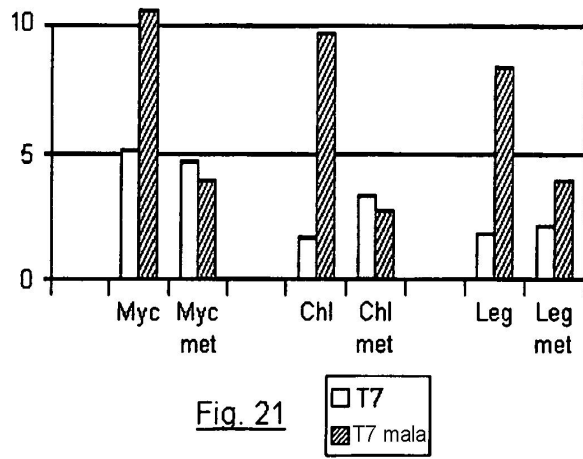


Fig. 21

