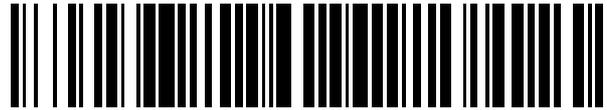


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 238**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10003758 .9**

96 Fecha de presentación: **08.04.2010**

97 Número de publicación de la solicitud: **2239339**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2010**

54 Título: **Composición de pigmento para el control de la transferencia de fluidos**

30 Prioridad:

09.04.2009 EP 09005256
04.08.2009 EP 09167140

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

ANKENBAUER, WALTRAUD;
HEINDL, DIETER;
JOSEL, HANS-PETER y
WEILKE, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 392 238 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

Composición de pigmento para el control de la transferencia de fluidos

5 Antecedentes de la invención

Los pigmentos ya se utilizan en la actualidad como controles para configuraciones de ensayos que requieren el pipeteado de varios componentes. Los conceptos de control existentes se basan en pigmentos presentes únicamente dentro de un componente y en la detección del color secundario tras la mezcla con otros componentes.

10 Especialmente los sistemas de PCR en tiempo real requieren una mezcla exacta de todos los componentes de reacción para obtener una cuantificación fiable y comparable, ya que la cantidad de material de muestra, de cebadores/sondas, así como las mezclas maestras requeridas para la PCR en tiempo real, influyen particularmente sobre el resultado de la cuantificación.

15 La mezcla maestra de PCR con un pigmento inerte se utiliza para minimizar los errores de pipeteado y se encuentran disponibles productos comerciales, tales como RedTaq de Sigma Aldrich o AbsoluteBlue de ThermoScientific (Yanek M., *BIOspektrum* 13(5):519-520, 2007). Alternativamente, los ingredientes (tales como, por ejemplo, la polimerasa) de los componentes pueden etiquetarse previamente a la mezcla, con el fin de obtener un control visual del procedimiento de pipeteado. Por ejemplo, RedTaq de Sigma Aldrich comprende una polimerasa etiquetada. La patente US nº 5.861.251 da a conocer reactivos de PCR liofilizados que comprenden un pigmento. Además, los materiales de sonda también pueden proporcionarse con un pigmento para la visualización (patente WO nº 2000/014505). Se utilizan pigmentos fluorescentes tales como ROX y parejas de FRET ROX/FAM a modo de estándares de calibración (patente US nº 5.736.333). Además, se han descritos composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos diana no marcados utilizando sondas polinucleótidas marcadas y antisondas parcialmente complementarias (patente WO nº 2008/021446). Srisa-Art *et al.* han mostrado el control de la proporción de composición mediante la utilización de pigmentos marcados de afinidad (*Analytical Chemistry* 79:6682-6689, 2007).

30 En la actualidad no existen sistemas de control conocidos del estado de la técnica para sistemas de PCR en tiempo real en los que el pigmento de control debe optimizarse de manera que el pigmento de detección de la PCR en tiempo real no resulte afectado y, en consecuencia, la adsorción del pigmento de control no debe solaparse con las canales de detección utilizados para el seguimiento de la PCR y el pigmento de control debe detectarse en un canal separado. Lo anterior resulta más difícil en el caso de que resulte necesario utilizar dos o más pigmentos de control debido a que la ventana espectral del seguimiento de la PCR es reducida para evitar la contaminación cruzada con respecto a todos los pigmentos de control.

35 La presente invención proporciona un sistema cerrado para la configuración de ensayo que comprende estrategias de control para identificar errores de volumen de por lo menos dos componentes que deben mezclarse para dichos ensayos.

40 Descripción resumida de la invención

Un aspecto de la presente invención es un kit para el control de la proporción de composición, comprendiendo dicho kit:

45 a) un primer componente que comprende un primer pigmento que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para emitir radiación o para transferir energía a un segundo pigmento, y

50 b) un segundo componente que comprende un segundo pigmento que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo dicho segundo pigmento excitable por una segunda luz de excitación o mediante transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento, caracterizado porque dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento están configurados de manera que:

- dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y
- 55 - dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dichos pigmentos se activa tras la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
- una mezcla de dichos primer y segundo pigmentos emite radiación al ser excitada con dicha primera o dicha segunda luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dichos primer y segundo pigmentos.

60 La expresión "transferencia de energía" se utiliza en toda la presente invención para resumir todas las transferencias de energía no radiativa conocidas por el experto en la materia. Una realización bien conocida de dicha transferencia de energía es la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). En la presente memoria, un cromóforo donante inicialmente en su estado excitado electrónico puede transferir energía a un cromóforo aceptor

65

(en estrecha proximidad, típicamente <10 nm) mediante acoplamiento no radiativo dipolo-dipolo.

Otra posible transferencia de energía es la transferencia electrónica inducida por fotones (PET). En este proceso, se aceptan electrones o se donan electrones al estado excitado de un pigmento fluorescente excitado, lo que resulta en la formación de una pareja de iones radicales que retorna al estado basal mediante recombinación no radiativa de cargas.

Dependiendo de los tipos de pigmento utilizados, la unión de dicho primer y dicho segundo grupos de afinidad puede ser reversible o irreversible.

En la totalidad de la descripción, la radiación emitida por la mezcla de pigmentos al excitarla con luz de excitación puede ser la radiación del pigmento excitado mismo o la radiación del otro pigmento no excitado por la luz de excitación, pero excitada indirectamente por la transferencia de energía desde el pigmento inicialmente excitado.

El término "pigmento" se utiliza para resumir todos los tipos de moléculas absorbentes de luz y, por lo tanto, comprende pigmentos fluorescentes, pigmentos no fluorescentes y moléculas inhibidoras.

Las moléculas inhibidoras son capaces de inhibir la fluorescencia de los pigmentos fluorescentes ya que son excitables por luz fluorescente y dispensan energía, por ejemplo calorífica. Los pigmentos no fluorescentes (también denominados moléculas donadoras oscuras) son pigmentos que no presentan sustancialmente emisión de fluorescencia, en contraste con los pigmentos fluorescentes convencionales.

Además, también pueden utilizarse estructuras aromáticas o heteroatómicas que presentan propiedades de inhibición de la emisión de fluorescencia. Estas estructuras moléculas son capaces de absorber energía de los pigmentos fluorescentes mediante un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET). Son ejemplos de estructuras heteroaromáticas, por ejemplo, estructuras moleculares simples como la guanina, la deazaguanina (ver el Ejemplo 2) o la isoguanosina que también pueden añadirse a grupos de afinidad.

Asimismo, los derivados del indol tales como el triptófano en las proteínas o el nitroindol incorporado como derivado desoxirribósido son compuestos bien conocidos que presentan propiedades inhibidoras. Además, los nitroaromatos tales como los derivados 2,4-dinitrofenilnilina, que se encuentran comercialmente disponibles como reactivos de marcaje para el marcaje de oligonucleótidos (en forma de fosforamidita) y de proteínas (en forma de ésteres de NHS) también son capaces de inhibir los fluoróforos.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un kit para el control de la proporción de composición, comprendiendo dicho kit:

a) un primer componente que comprende un pigmento fluorescente que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para transferir energía a una estructura aromática o heteroaromática, y

b) un segundo componente que comprende una estructura aromática o heteroaromática que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo dicha estructura aromática o heteroaromática excitable mediante transferencia energética a partir de dicho primer pigmento, de manera que dicha estructura aromática o heteroaromática impide la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente.

caracterizado porque dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática están configurados de manera que:

- dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática se activa con la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
- dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y
- una mezcla de dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática emite radiación al ser excitada con dicha primera luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática.

En toda la descripción, los pigmentos del kit pueden añadirse a componentes que necesitan mezclarse para que se produzca una reacción subsiguiente y el control de la proporción de composición en este caso se refiere a la composición de dichos componentes. Dichos componentes son, por ejemplo, reactivos, tampones, componentes biológicos o muestras.

También se da a conocer un kit para el control de la proporción de composición que comprende:

a) un primer componente que comprende un primer pigmento que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para emitir radiación o para transferir energía a otro componente, y

b) un segundo componente que comprende un segundo pigmento que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo excitable dicho segundo pigmento por radiación o por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento,

5 caracterizado porque dicho primer componente y dicho segundo componente deben combinarse en una proporción de composición predefinida,
en el que dicha proporción de composición es controlable mediante medición de la radiación emitida por dichos pigmentos tras la excitación por luz de excitación, y
10 en el que dichos primer y segundo grupos de afinidad han sido diseñados para unirse entre sí, en los que la transferencia de energía entre dichos pigmentos se activa tras la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad.

Dicho kit resume todos los tipos de kit que presentan varios componentes que deben mezclarse antes de llevar a cabo un determinado procedimiento de producción o ensayo analítico. En consecuencia, dicho kit presenta por lo
15 menos dos componentes, comprendiendo cada uno un determinado pigmento, mientras que dichos componentes son, por ejemplo, reactivos, tampones o compuestos biológicos.

Se da a conocer una composición de pigmentos con una proporción de composición que depende de la emisión de luz, comprendiendo dicha composición de pigmentos:

20 a) un primer pigmento que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para emitir radiación o para transferir energía a otro componente, y
b) un segundo pigmento que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo excitable dicho segundo pigmento por radiación o por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento,

25 caracterizado porque dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se proporcionan de manera que:
- dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dichos pigmentos se activa tras la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
- la radiación emitida por la composición de pigmento tras la excitación por luz de excitación es una medida
30 de la proporción de composición de dicho primer pigmento y de dicho segundo pigmento.

Todavía otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de la proporción de composición de dos componentes utilizando el kit según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad,
b) llevar a cabo una primera medición de radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento no se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad,
40 c) llevar a cabo una segunda medición de radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad, y
d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

45 El método indicado anteriormente se describe de manera general con respecto a la mezcla de dos componentes, pero el experto en la materia apreciará que el método también puede utilizarse para más componentes. Por ejemplo, resulta posible utilizar un tercer componente que comprende un tercer pigmento; dicho tercer pigmento debe presentar una longitud de onda de la radiación diferente de la del primer y segundo pigmentos. En el caso de que la proporción de cuatro componentes deba verificarse, pueden utilizarse dos kits según la presente invención de manera que el primer y el segundo pigmentos presenten afinidad de unión mutua, mientras que el tercer pigmento únicamente presente afinidad de unión para el cuarto pigmento.

50 El método descrito se lleva a cabo a lo largo de la progresión de las etapas a)-d); los pigmentos deben encontrarse en el estado unido, así como en el estado no unido, tras la mezcla y, por lo tanto, la unión de los dos grupos de afinidad respectivos debe ser reversible.

Todavía otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de la proporción de composición de dos componentes utilizando el kit según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

60 a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad,
b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha primera medición de la fluorescencia se
65 lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y

c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha segunda medición de la fluorescencia se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y

5 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

10 En dicho método, ambas mediciones de radiación se llevan a cabo con los pigmentos unidos entre sí mediante sus grupos de afinidad. En consecuencia, resulta posible, aunque no esencial, que la unión de los dos grupos de afinidad respectivos sea irreversible.

15 Tal como se ha indicado anteriormente, también pueden utilizarse estructuras aromáticas o heteroaromáticas en lugar de pigmentos y, por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de la proporción de composición de dos componentes utilizando el kit según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el pigmento fluorescente que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende la estructura aromática o heteroaromática que presenta dicho segundo grupo de afinidad,

20 b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha primera medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente,

25 c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha segunda medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente, y

30 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

Descripción detallada de la invención

35 Un aspecto de la presente invención es un kit para el control de la proporción de composición, comprendiendo dicho kit:

a) un primer componente que comprende un primer pigmento que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para emitir radiación o para transferir energía a un segundo pigmento, y

40 b) un segundo componente que comprende un segundo pigmento que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo excitable dicho segundo pigmento por una segunda luz de excitación o por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento,

caracterizado porque dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se configuran de manera que:

45 - dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y

50 - dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dichos pigmentos se activa tras la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y

- una mezcla de dichos primer y segundo pigmentos emite radiación al ser excitada con dicha primera o dicha segunda luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dichos primer y segundo pigmentos.

55 A continuación se describen varios grupos de afinidad preferentes que resultan adecuados para el kit tal como se describe en la presente memoria. Tal como se ilustra en la figura 1, todos los pigmentos con sus grupos de afinidad han sido diseñados de manera que los pigmentos se unan directamente entre sí mediante los grupos de afinidad. En consecuencia, en toda la presente solicitud la unión de los grupos de afinidad entre sí debe entenderse como una unión directa o específica mutua y, por lo tanto, la unión indirecta de los grupos de afinidad mediante una tercera molécula no es parte de la presente invención.

60 Un kit tal como se da a conocer en la presente memoria es un kit en el que dicho primer grupo de afinidad es un grupo biotina y dicho segundo grupo de afinidad es un grupo estreptavidina.

65 Otro kit tal como se da a conocer en la presente memoria es un kit en el que dicho primer grupo de afinidad es un grupo digoxigenina y dicho segundo grupo de afinidad es un anticuerpo anti-digoxigenina.

Todavía otro kit tal como se da a conocer en la presente memoria es un kit en el que dicho primer grupo de afinidad es una lectina y dicho segundo grupo de afinidad es un sacárido.

- 5 Otro kit tal como se da a conocer en la presente memoria es un kit en el que dicho primer grupo de afinidad es un anticuerpo y dicho segundo grupo de afinidad es un hapteno.

10 Todavía otro kit tal como se da a conocer en la presente memoria es un kit en el que dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido.

15 Resulta preferente la utilización de oligonucleótidos como grupos de afinidad porque resulta fácil pasar entre los estados de unido y no unido de estas moléculas mediante ajuste de la temperatura de la solución a un nivel superior o inferior a la temperatura de fusión del híbrido respectivo.

En toda la descripción se utiliza el término oligonucleótido como incluyendo ADN, ARN y también análogos de oligonucleótido, en los que el prerrequisito único es que dichos análogos todavía sean capaces de formar un dúplex estable entre sí. Dichos análogos de oligonucleótido podrían comprender diferentes modificaciones.

20 Una clase de análogos son derivados de los nucleótidos naturales, dA, dG, dC, dT y dU, con sustituyentes en la nucleobase. Son ejemplos:

25 pirimidinas sustituidas en posición 5, tales como 5-metil-dC, 5-aminoalil-dU o 5-aminoalil-dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o 5-propinil-dC, dU 5-halogenado y dC 5-halogenado, citidinas N4-sustituidas, por ejemplo N4-etil-dC, purinas N-sustituidas, por ejemplo N6-etil-dA, N2-etil-dG, purinas sustituidas en posición 8, por ejemplo 8-[(6-amino)-hex-1-il]-8-amino-dG ó 8-[(6-amino)-hex-1-il]-8-amino-dA, 8-halógeno-dA ó 8-halógeno-dG, 8-alquil-dG ó 8-alquil-dA, o dA sustituido en posición 2, tal como 2-amino-dA.

30 Una clase de análogos son derivados de los nucleótidos naturales, dA, dG, dC, dT y dU, con sustituyentes en la fracción D-ribosa. Son ejemplos:
2'-metoxi, 2'-fluro, 2'-metilseleno-dU, 2'-aliloxi, 4'-metil-dU, dT; dU, dA o dG.

35 Otra clase son los análogos en los que otras nucleobases (no estándares) aparte de las bases estándares, A, G, C, T y U, se unen a la fracción sacárido desoxirribosa, o en los que las bases estándares se unen a un análogo de sacárido o una combinación de ambos, en la que se unen otras nucleobases aparte de las bases estándares a un análogo de sacárido.

40 Son ejemplos de bases no estándares unidas a la D-ribosa: 5-nitroindol-D-ribosa, 3-nitropirrol-D-ribosa, 7-deaza-dG y 7-deaza-dA, 7-deaza-dI, 7-deaza-dX, 7-deaza-8-aza-dG y 7-deaza-8-aza-dA, 7-deaza-8-aza-dI, 7-deaza-8-aza-dX, 8-aza-dA, 8-aza-dG, 8-aza-dI, 8-aza-dX, D-formicina y pseudo-dU. Pseudo-iso-dC, 4-tio-dT, 6-tio-dG, 2-tio-dT, iso-dG, 5-metil-iso-dC, 5,6-dihidro-5-aza-dC, eteno-dA y pirrol-dC.

45 Los análogos de sacárido se seleccionan de entre: xilosa, ribosa con puente 2',4', tal como 2'-O, 4'-C-metileno (oligómero conocido como LNA) ó 2'-O, 4'-C-etileno (oligómero conocido como ENA), L-2-desoxirribosa, hexitol (oligómero conocido como HNA), ciclohexeno (oligómero conocido como CeNA), alritol (oligómero conocido como ANA), análogo de ribosa tricíclica en el que los átomos C3' y C5' se encuentran conectados mediante un puente etileno que está fusionado a un anillo ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN), glicerina (oligómero conocido como GNA), glucopiranososa (oligómero conocido como ADN-Homo), carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de la subunidad tetrahidrofurano) y morfolina (oligómeros conocidos como morfolino-ADN).

50 Dichos análogos de nucleótido podrían derivatizarse adicionalmente, por ejemplo 7-propargil-7-deaza-G, ó 5-aminoalil-hexitol-U, 2'-fluro-d(L)-ribosa.

55 Una clase adicional de análogos son los oligonucleótidos, en los que el puente fosfato internucleosídico se encuentra modificado, tal como en los oligonucleótidos fosforotioato-metilfosfonato o fosforamidato.

60 Otra clase de oligonucleótido comprende un esqueleto con enlaces peptídicos; un ejemplo bien conocido es el APN. El esqueleto del APN está compuesto de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas mediante enlaces peptídicos.

65 En el caso de que la emisión lumínica dependiente de la proporción de la mezcla de pigmentos según la presente invención se utilice para verificar la proporción de componentes para una posterior amplificación por PCR, resulta especialmente preferente utilizar L-nucleótidos para los grupos de afinidad. Dichos L-nucleótidos, que presentan la conformación L del sacárido en lugar de la conformación D de los nucleótidos naturales, todavía proporcionan propiedades de hibridación pero la polimerasa ya no las reconoce. En consecuencia, dichos L-nucleótidos todavía

pueden ser utilizados como grupos de afinidad sin afectar potencialmente a las reacciones de PCR.

Puede conseguirse el mismo efecto ortogonal indicado anteriormente para los L-nucleótidos utilizando los AGN, homo-ADN y los oligonucleótidos que comprenden pares de bases ortogonales (tales como iso-dG e iso-dC).

5 Un kit más preferente según la presente invención es un kit en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos.

10 Pueden utilizarse varias combinaciones de pigmentos y a continuación se describen algunas combinaciones adecuadas. En la figura 1 se ilustran diferentes combinaciones de dicho primer pigmento (I) y dicho segundo pigmento (II), en la que la figura 1a comprende las realizaciones que requieren dichos pigmentos tanto en el estado no unido (izquierda) como en el estado unido (derecha), y en la que la figura 1b comprende las realizaciones que requieren dichos pigmentos únicamente en el estado unido.

15 Un kit preferente según la presente invención es un kit en el que dicho primer pigmento es un pigmento fluorescente y dicho segundo pigmento es una molécula inhibidora, siendo dicha molécula inhibidora excitable mediante transferencia energética a partir de dicho pigmento fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicha molécula inhibidora impide la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente.

20 Un caso especial de dicha realización de inhibición es la configuración denominada de autoinhibición, en la que dicho pigmento fluorescente y dicha molécula inhibidora son la misma molécula y un pigmento fluorescente resulta inhibido por otro. Esta autoinhibición se produce mediante una interacción pigmento-pigmento que resulta inducida por poner en estrecha proximidad las moléculas de pigmento, por ejemplo mediante el incremento de la concentración de pigmento a un nivel superior a determinado límite. La mayoría de los pigmentos fluorescentes proporcionan dichas propiedades de autoinhibición, especialmente las rodaminas, los bora-díaza-indacenos (conocidos como pigmentos Bodipy), las cianinas, las fluoresceínas o las oxazinas.

25 Por lo tanto, otro kit preferente según la presente invención es un kit en el que dicho pigmento fluorescente y dicha molécula inhibidora son la misma molécula.

30 En esta realización de la presente invención, el pigmento fluorescente resulta excitado por luz de excitación que presenta una longitud de onda adecuada (λ_1 Ex) y se realiza un seguimiento de la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente (λ_1 Em) (fig. 1a/ii). En el caso de que el pigmento fluorescente y la molécula inhibidora no se unan entre sí, se detectará emisión de fluorescencia (λ_1 Em) y la intensidad de la emisión será una medida de la cantidad de pigmento fluorescente. En el caso de que el pigmento fluorescente y la molécula inhibidora se unan entre sí, la emisión de fluorescencia resultará inhibida por la molécula inhibidora. En consecuencia, la emisión de fluorescencia (λ_1 Em) será reducida y la reducción de la intensidad será una medida de la cantidad de moléculas de inhibidor.

35 Otro kit preferente según la presente invención es un kit en el que dicho primer pigmento es un primer pigmento fluorescente y dicho segundo pigmento es un segundo pigmento fluorescente, presentando dicho segundo pigmento fluorescente un máximo de excitación a una longitud de onda más larga que dicho primer pigmento fluorescente y en el que dicho segundo pigmento fluorescente es excitable por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicho segundo pigmento fluorescente emite luz fluorescente que presenta una longitud de onda diferente de la longitud de onda de dicho primer pigmento fluorescente.

40 En la esta realización se utilizan dos pigmentos fluorescentes que presentan diferentes longitudes de onda de excitación. En el caso de los grupos de afinidad unidos, utilizando la excitación específica del primer pigmento fluorescente (λ_1 Ex, una excitación directa prácticamente nula del segundo pigmento fluorescente), se produce una transferencia de energía al segundo pigmento fluorescente, de manera que la emisión de fluorescencia específica del segundo pigmento fluorescente (λ_{II} Em) se hace detectable (fig. 1a/i). Por otra parte, no hay emisión de fluorescencia específica del segundo pigmento fluorescente (λ_{II} Em) detectable con grupos de afinidad no unidos con la excitación con λ_1 Ex, sino que λ_{II} Em sólo resulta detectable al utilizar λ_{II} Ex como excitación. En consecuencia, la emisión de fluorescencia será una medida de la proporción entre el primer y el segundo pigmentos fluorescentes.

45 Todavía otro kit preferente según la presente invención es un kit en el que dicho primer pigmento es un pigmento no fluorescente y dicho segundo pigmento es un pigmento fluorescente, siendo dicho pigmento fluorescente excitable mediante transferencia energética a partir de dicho pigmento no fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicho pigmento fluorescente emite luz fluorescente.

50 Esta realización es similar a la realización con dos pigmentos fluorescentes indicada anteriormente, excepto en que el pigmento no fluorescente al ser excitado con su excitación específica (λ_1 Ex) no emite sustancialmente una emisión fluorescente específica por sí mismo. La expresión pigmento no fluorescente se utiliza en toda la presente invención análogamente a la descripción de la patente US nº 2007/0077588, es decir, un pigmento no fluorescente es un pigmento con una emisión de fluorescencia sustancialmente nula, en contraste con los pigmentos

fluorescentes convencionales, que emiten la mayor parte de su energía mediante fluorescencia. Únicamente con grupos de afinidad unidos se hace detectable la emisión específica de fluorescencia del segundo pigmento fluorescente (λ_{II} Em) en el caso de que, al producirse la excitación específica del primer pigmento no fluorescente con su longitud de onda de excitación específica (λ_I Ex, prácticamente ninguna excitación directa del segundo pigmento fluorescente), se produzca una transferencia de energía al segundo pigmento fluorescente, emitiendo la fluorescencia específica del segundo pigmento fluorescente (λ_{II} Em, fig. 1a/iii). En el caso de grupos de afinidad no unidos, no se hace detectable ninguna emisión de fluorescencia específica del segundo pigmento fluorescente con la excitación con λ_I Ex, sino que λ_{II} Em sólo resulta detectable al utilizar λ_{II} Ex como excitación. En consecuencia, la emisión de fluorescencia será una medida de la proporción entre el pigmento no fluorescente y el pigmento fluorescente. Dichos pigmentos no fluorescentes también pueden denominarse moléculas donadoras oscuras.

Tal como se ha indicado anteriormente, los pigmentos del kit pueden añadirse a componentes que necesitan mezclarse para que se produzca una reacción subsiguiente y el control de las proporciones de la composición en este caso se refiere a la composición de dichos componentes de reacción. En consecuencia, dichos componentes de reacción pueden ser parte del kit.

Se da a conocer un kit en la presente memoria que comprende además un primer componente de reacción.

Para utilizar los pigmentos de dicho kit para un control de las proporciones de la composición de dicho componente de reacción y una muestra que no es parte del kit, resulta necesario añadir un pigmento a dicha muestra y el otro pigmento debe encontrarse contenido en dicho componente de reacción. Puede proporcionarse un componente de reacción con un pigmento en por lo menos dos maneras diferentes.

En dicho kit, dicho primer componente de reacción comprende dicho primer pigmento.

Dicho primer pigmento puede añadirse a dicho primer componente de reacción previamente a la utilización de dicho primer componente de reacción.

El kit comprende además un segundo componente de reacción, comprendiendo opcionalmente dicho segundo componente de reacción dicho segundo pigmento.

El experto en la materia apreciará que muchos kits diferentes que comprenden pigmentos y componentes de reacción se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención y a continuación se describen de manera general a título de ejemplo algunos de estos kits.

Se describe un kit de PCR en el que dicho primer componente de reacción es una mezcla maestra que comprende dicho primer pigmento y dicho segundo componente de reacción es una solución tampón que comprende dicho segundo pigmento que debe añadirse a una muestra, comprendiendo dicha muestra la diana que debe amplificarse. Alternativamente, el primer o segundo componente de reacción puede ser una mezcla de detección necesaria para dicha PCR.

Además, se describe un kit de preparación de muestra, en el que dicho primer componente de reacción es un tampón de lisis/unión que comprende dicho primer pigmento y dicho segundo componente de reacción es una solución de perlas magnéticas que comprende dicho segundo pigmento. Alternativamente, el primer o segundo componente de reacción es una solución tampón que comprende dicho segundo pigmento que debe añadirse a una solución de muestra.

Se da a conocer además un kit de inmunoensayo, en el que dicho primer componente de reacción es un anticuerpo específico que comprende dicho primer pigmento y dicho segundo componente de reacción es un conjugado de anticuerpo para la detección que comprende dicho segundo pigmento. Alternativamente, el primer o segundo componente de reacción es una solución tampón que comprende dicho segundo pigmento que debe añadirse a una solución de muestra.

Tal como se ha indicado anteriormente, también pueden utilizarse determinadas estructuras moleculares (tales como estructuras aromáticas o heteroaromáticas) a modo de compuestos inhibidores para la presente invención, con la condición de que presenten propiedades de inhibición de la emisión de fluorescencia (ver el Ejemplo 2).

Por lo tanto, otra realización según la presente invención es un kit para el control de las proporciones de la composición, comprendiendo dicho kit:

- a) un primer componente que comprende un pigmento fluorescente que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para transferir energía a una estructura aromática o heteroaromática, y
- b) un segundo componente que comprende una estructura aromática o heteroaromática que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo dicha estructura aromática o heteroaromática excitable mediante transferencia energética a partir de dicho primer pigmento, de manera que dicha estructura aromática o

heteroaromática impide la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente.

caracterizado porque dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática están configurados de manera que:

- 5
- dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática se activa con la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
 - 10 - dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y
 - una mezcla de dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática emite radiación al ser excitada con dicha primera luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática.

15

Todavía otro kit es un kit en el que dicha estructura heteroaromática es una estructura que comprende guanina, deazaguanina, iso-guanina ó 7-deaza-iso-guanina. Además, se describe un kit en el que dicha estructura heteroaromática son nucleótidos con guanina ó 7-deazaguanina como nucleobase. Además, se combina un nucleótido con un oligonucleótido homooligomérico, por ejemplo (dG)₃ (también denominado, en el contexto de las secuencias oligonucleótidas, GGG) o (7-deaza-dG)₃. Alternativamente, puede utilizarse nitroindol-desoxirribósido (una base universal bien conocida) u homooligómeros del mismo, a modo de compuestos inhibidores.

20

Todavía otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de las proporciones de la composición de dos componentes utilizando el kit según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 25
- a) mezclar los dos componentes, en el que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad, b) llevar a cabo una primera medición de la radiación con la excitación con luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento no se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad,
 - 30 c) llevar a cabo una segunda medición de radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad, y
 - d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.
- 35

Con el fin de llevar a cabo dicha realización del método de verificación de las proporciones de la composición de dos componentes, resulta esencial medir la radiación con los dos pigmentos tanto en estado unido como en estado no unido. En el caso de que las etapas de dicho método se lleven a cabo durante la progresión de las etapas a)-d), anteriormente, resulta necesario que la unión de los dos grupos de afinidad sea reversible. Dependiendo de los grupos de afinidad utilizados, el experto en la materia conocerá los procedimientos que permitan o impidan la unión.

40

Tal como se ha indicado anteriormente con respecto al kit, todos los grupos de afinidad han sido diseñados para una unión directa de los pigmentos entre sí mediante una unión específica de sus grupos de afinidad (ver la figura 19. Además, el experto en la materia apreciará que dicha unión específica de los grupos de afinidad entre sí resulta esencial para llevar a cabo los métodos descritos, ya que, de otro modo, una determinada parte de los pigmentos podría unirse a otros ingredientes de los componentes, de manera que ya no se encontrase disponible para las mediciones de control de las proporciones, produciendo resultados falsos. En consecuencia, los grupos de afinidad se han diseñado de manera que no se produzcan interferencias con otros ingredientes de los componentes, sino sólo una unión específica entre sí. Por lo tanto, el experto en la materia apreciará que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento deben unirse específicamente entre sí mediante dichos grupos de afinidad en el caso de que se cumplan las condiciones apropiadas. En otro método preferente según la presente invención, dichas primeras mediciones de la radiación de la etapa b) se llevan a cabo a parámetros de composición en los que se encuentra bloqueada la unión entre dicho primer grupo de afinidad y dicho segundo grupo de afinidad.

45

Los parámetros de la composición que pueden ajustarse son, por ejemplo, la temperatura, el pH o la molaridad de la composición. En el caso de que se utilicen oligonucleótidos como grupos de afinidad, la unión puede inducirse mediante ajuste de la temperatura de la composición, de manera que la temperatura sea superior o inferior a la temperatura de fusión del híbrido respectivo.

50

Alternativamente, la progresión de las etapas a)-d) anteriormente puede modificarse de manera que la primera medición de radiación se lleve a cabo antes de la mezcla de ambos componentes. Lo anterior presenta la ventaja de que también pueden utilizarse grupos de afinidad con una unión irreversible.

55

En un método preferente según la presente invención, dichas primeras mediciones de la radiación de la etapa b) se llevan a cabo con dicho primer componente previamente a la mezcla de los dos componentes en la etapa a).

Dependiendo de los pigmentos utilizados para la presente invención pueden utilizarse varias combinaciones diferentes de longitudes de onda de excitación y de emisión.

5 En todavía otro método preferente según la presente invención, dichas primeras mediciones de la radiación de la etapa b) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho primer pigmento.

10 Dicha primera medición de la radiación puede llevarse a cabo con únicamente el primer pigmento presente o con ambos pigmentos presentes en el estado no unido. En el caso de que se utilice un pigmento no fluorescente no se detecta intensidad de emisión con la excitación.

15 No se mide intensidad de emisión de dicho primer pigmento en el caso de que dicho primer pigmento sea un pigmento no fluorescente.

Alternativamente, la primera medición de radiación puede llevarse a cabo con las longitudes de onda de excitación y de emisión específicas del segundo pigmento, en el caso de que ambos pigmentos se encuentren presentes en el estado no unido.

20 Un método preferente según la presente invención es un método en el que dichas primeras mediciones de radiación de la etapa b) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho segundo pigmento.

25 Además, resulta posible llevar a cabo la primera medición de radiación con la longitud de onda de excitación específica del primer pigmento y la longitud de onda de emisión específica del segundo pigmento, en el caso de que ambos pigmentos se encuentren presentes en el estado no unido.

Dependiendo de la primera medición de radiación, la segunda medición de radiación preferentemente se adapta de manera que se mida la misma longitud de onda de emisión en ambas mediciones.

30 Otro método preferente según la presente invención es un método en el que dicha segunda medición de radiación de la etapa c) se lleva a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho segundo pigmento.

35 Se describe otro método preferente en el que dicha segunda medición de radiación de la etapa c) se lleva a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho segundo pigmento.

40 En consecuencia, en el caso de que la segunda medición de radiación se base en la longitud de onda específica del segundo pigmento, se infiere que también la primera medición de radiación se basará en la misma longitud de onda específica del segundo pigmento. Las combinaciones de pigmentos de la presente realización son, por ejemplo, la combinación pigmento/pigmento (ver la figura 1a/i) o la combinación pigmento no fluorescente-pigmento (ver la figura 1a/iii).

45 Se da a conocer un método adicional en el que dicha segunda medición de radiación de la etapa c) se lleva a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho primer pigmento.

50 En consecuencia, en el caso de que la primera medición de radiación se base en la longitud de onda de excitación específica del primer pigmento, la segunda medición de radiación se basará en la misma longitud de onda de excitación específica del primer pigmento. Las combinaciones de pigmentos de la presente realización son, por ejemplo, la combinación de pigmento/inhibidor (ver la figura 1a/ii).

55 Todavía otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de las proporciones de la composición de dos componentes según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad,

60 b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha primera medición de la fluorescencia se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y

65 c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha segunda medición de la fluorescencia se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y

mediendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y
 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

5 En la presente realización del método de verificación de las proporciones de la composición de dos componentes, se llevan a cabo ambas mediciones de radiación con los grupos de afinidad en el estado unido (ver la figura 1b). Debido a que la transferencia de energía se produce únicamente en una dirección, resulta posible medir uno de los pigmentos independientemente del otro incluso en el estado unido.

10 Dicha unión entre dicho primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y dicho segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad puede ser irreversible.

Debido a que los pigmentos se encuentran en el estado unido en ambas mediciones de radiación, resulta posible, aunque no esencial, que la unión entre los dos grupos de afinidad sea irreversible.

15 Todavía otro aspecto de la presente invención es un método de verificación de las proporciones de la composición de dos componentes utilizando el kit según la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

20 a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el pigmento fluorescente que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende la estructura aromática o heteroaromática que presenta dicho segundo grupo de afinidad,

25 b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha primera medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente,

30 c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha segunda medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente, y

35 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

Un método preferente según la presente invención es un método en el que dicha primera medición de la radiación de la etapa b) se lleva a cabo con dicho primer componente previamente a la mezcla de los dos componentes en la etapa a).

40 La primera medición de radiación de la etapa b) puede llevarse a cabo bajo parámetros de la composición en los que la unión entre dicho primer grupo de afinidad y dicho segundo grupo de afinidad se encuentra bloqueada.

Descripción de las figuras

Figura 1 Diferentes realizaciones de la presente invención basadas en: a) una medición en estado no unido, así como una medición en estado unido, y b) ambas mediciones en estado unido.

45 Figura 2 Curvas de amplificación para diferentes composiciones de dos componentes.

Figura 3 Rendimiento experimental basado en dos controles para diferentes composiciones de dos componentes.

Figura 4 Comparación entre diferentes moléculas de inhibidor.

50 Figura 5 Magnitud de la variación del pigmento no fluorescente en una realización que utiliza un pigmento no fluorescente y un pigmento fluorescente.

Figura 6 Magnitud de la variación de un pigmento fluorescente en una realización que utiliza un pigmento no fluorescente y un pigmento fluorescente.

Figura 7 Realización de la presente invención que utiliza DIG/anti-DIG como grupos de afinidad de un pigmento no fluorescente y un pigmento fluorescente.

55 Ejemplo 1

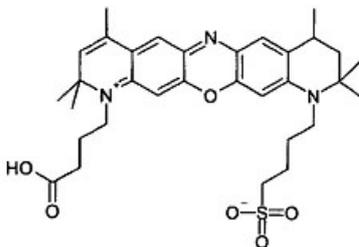
Configuración de PCR con dos soluciones componentes que contienen los dos componentes de control

60 Mezclas de componentes

A) Una mezcla maestra concentrada 2 veces, compuesta de:

65 - 'RealTime ready DNA Master, Probes', una mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real (Roche Applied Science, nº de cat. 05502381001), que incluye oligonucleótido 4 µM según la SEC ID nº 3 terminalmente marcado en el extremo 5' con un pigmento fluorescente de longitud de onda larga (JA286, Roche Applied

Science, máximo de excitación a 686 nm, máximo de emisión a 703 nm).



Estructura del pigmento JA286

- 5
- 1 ng/μl de ADNc humano (ADNc de referencia humano de qPCR, Clontech, nº de cat. 639654).
- B) Una mezcla de detección concentrada 2 veces para el gen GAPDH de ADNc humano que contiene los componentes siguientes:
- 10
- 1 μM de cada uno de los cebadores de GAPDH humano según las SEC ID nº 1 y nº 2,
 - 0,8 μM de una sonda UPL del GAPDH humano (biblioteca de sondas universal, sonda nº 60, Roche Applied Science, nº de cat. 04688589001),
 - oligonucleótido 4 μM según la SEC ID nº 4 marcado terminalmente en el extremo 3' con el inhibidor no fluorescente dabsilo (Roche Applied Science, patente WO nº 2007/059816, sintetizado mediante la utilización de dabsilo-CPG disponible comercialmente).

15 Los dos oligonucleótidos según SEC ID nº 3 y nº 4 son complementarios.

Configuración de la placa de PCR multipocillo

20 Con el fin de demostrar el efecto de diferentes proporciones de las soluciones de dos componentes de la mezcla de reacción en la medición de control, se dispensaron diferentes combinaciones de mezcla maestra A y mezcla de detección B en una placa de PCR de 1.536 pocillos (Roche Applied Science, nº de cat. 05358639001) utilizando un robot de manipulación de líquidos Nanodrop Express (Innovadyne, componente nº 12043 (módulo de fluidos) y 11245 (módulo de pletina)).

25

Nº de combinación	Mezcla maestra A 2x [μl]	Mezcla maestra B 2x [μl]
1	0	1
2	0,5	1
3	1	1
4	1	0,5
5	1	0
6	0	0
7	0,5	0,5

Se dispensó cada combinación en 96 posiciones de la placa de 1.536 pocillos, representando réplicas técnicas.

30 Protocolo de PCR y medición de control

La amplificación en tiempo real y las mediciones de control del pipeteado se llevaron a cabo en un instrumento LightCycler 1536 con el software de análisis proporcionado (Roche Applied Science).

35 PCR en tiempo real:

La amplificación se llevó a cabo utilizando la combinación de filtro 465 (excitación) / 510 (emisión).

	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo de espera (s)	Velocidad de cambio (°C/s)	Adquisición
desnaturalización	1	95	60	4,8	ninguna

amplificación	45	95 60	0 30	4,8 2,5	ninguna única
enfriamiento	1	40	30	2,5	ninguna

Medición de control:

Se llevaron a cabo dos adquisiciones únicas utilizando la combinación de filtro 618 (excitación) / 660 (emisión).

5

	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo de espera (s)	Velocidad de cambio (°C/s)	Adquisición
1. Adquisición	1	55	10	4,8	única
2. Adquisición	1	37	10	2,5	única

Se calculó la proporción entre la adquisición a alta temperatura y la adquisición a baja temperatura para cada pocillo de la placa de reacción.

10 Resultados:

En las soluciones de dos componentes con reducción de 50% de uno de los dos componentes las curvas de amplificación todavía eran evaluables, aunque se inició una bajada del rendimiento de la PCR (ver la fig. 2). Con un componente omitido los resultados fueron negativos.

15

La proporción de las mediciones del control indicaron claramente la falta de un componente. Cuanto más se redujo uno de los componentes de las soluciones de dos componentes, menor era la proporción calculada (ver la fig. 3). Mediante la fijación de un valor de corte de la proporción (para el presente experimento a un valor de 2, por ejemplo), todos los pocillos con un error de pipeteado simulado que conducían a resultados no válidos mostrarán un valor de la proporción inferior al valor de corte y pueden marcarse en una tabla de resultados. Con un volumen de reacción reducido pero partes correctas de los componentes, no resultaron influidos ni los resultados de PCR ni las proporciones del control.

20

Ejemplo 2

25

Utilización de diferentes moléculas de inhibidor para el segundo componente de control

Para comprobar el rendimiento del concepto de control descrito con diversos pigmentos o moléculas de inhibidor, se mostraron los cambios dependientes de la temperatura de la señal de fluorescencia para diferentes inhibidores disponibles.

30

Mezcla de reacción compuesta de:

35

- 'RealTime ready DNA Master, Probes' (Roche Applied Science, nº de cat. 05502381001), incluyendo oligonucleótido 2 µM según la SEC ID nº 3 terminalmente marcado en el extremo 5' con un pigmento fluorescente de longitud de onda larga (JA286, Roche Applied Science, máximo de excitación a 686 nm, máximo de emisión a 703 nm; ver el Ejemplo 1).
- Oligonucleótido 2 µM según la SEC ID nº 4, marcado terminalmente en el extremo 3' con uno de los inhibidores alternativos siguientes:

40

- Dabsilo
- Dabcilo
- BHQ-2
- 3x dG adicional
- 3x deaza-dG
- JA286 (para la autoinhibición del pigmento)
- sin control de inhibidor

45

Protocolo

50

Se pipetearon 10 µl de cada una de las 7 mezclas en una placa de PCR de 384 pocillos (Roche Applied Science, nº de cat. 04729749001) y se midió la fluorescencia con un gradiente creciente de temperaturas en un instrumento LightCycler 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05015243001).

55

Combinación de filtro 618 (excitación) / 660 (emisión).

	Temp. (°C)	Tiempo de espera (s)	Velocidad de cambio (°C/s)	Adquisición	Adq./°C
Curva de fusión	20	10	4,8	ninguna	-
	95	-	0,11	continua	5

Resultados

5 Con todos los inhibidores sometidos a ensayo se observó un incremento sustancial de la fluorescencia al exceder la temperatura de fusión del oligonucleótido y se detuvo la unión del primer componente pigmento al segundo componente inhibidor (ver la fig. 4). Por lo tanto, todos dichos inhibidores resultarían adecuados para el concepto de control con dos mediciones a diferentes temperaturas en estado unido y en estado no unido.

10 Ejemplo 3

Utilización de un pigmento no fluorescente para el segundo componente de control

15 En el presente método, las mediciones de control se realizaron a temperatura constante a la misma longitud de onda de detección de fluorescencia pero con dos longitudes de onda de excitación diferentes. El pigmento en el primer componente puede medirse con excitación directa. En el caso de que el pigmento no fluorescente (ver la patente US nº 2007/0077588) del segundo componente se encuentre unido al primer pigmento mediante los grupos de afinidad, esta combinación se mide con excitación del pigmento no fluorescente a una longitud de onda corta sin excitación directa del primer pigmento. Sin embargo, la emisión de fluorescencia del primer pigmento se produce debido a la transferencia de energía desde el pigmento no fluorescente excitado hasta el primer pigmento, situado en estrecha proximidad.

25 Mezclas de componentes

A) Componente A concentrada 2 veces, compuesta de:

30 - 'RealTime ready DNA Master, Probes', una mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real (Roche Applied Science, nº de cat. 05502381001), que incluye oligonucleótido 4 µM según la SEC ID nº 3 terminalmente marcado en el extremo 5' con un pigmento fluorescente de longitud de onda larga (JA286, Roche Applied Science, máximo de excitación a 686 nm, máximo de emisión a 703 nm; ver el Ejemplo 1).

B) Componente B concentrada 2 veces, que contiene:

35 - Oligonucleótido 4 µM según la SEC ID nº 4, marcado terminalmente en el extremo 3' con el pigmento no fluorescente (4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína (5-DmF)).

Los dos oligonucleótidos según SEC ID nº 3 y nº 4 son complementarios.

40 Configuración de la placa de PCR multipocillo

Con el fin de demostrar el efecto de diferentes cantidades de las soluciones de dos componentes de la mezcla de reacción en la medición de control, se pipetearon diferentes cantidades de componente A y componente B a pocillos de una placa de PCR de 384 pocillos (Roche Applied Science, nº de cat. 04729749001).

45

Nº de combinación	Componente A [µl]	Componente B [µl]
1	0	5
2	1,25	5
3	2,5	5
4	3,75	5
5	5	5
6	7,5	5
7	5	0

ES 2 392 238 T3

8	5	1,25
9	5	2,5
10	5	3,75
11	5	5
12	5	7,5

Se dispensó cada combinación en 96 posiciones de la placa de 1.536 pocillos, representando réplicas técnicas.

5 Protocolo

Se midió la fluorescencia en un instrumento LightCycler 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05015243001) a una temperatura constante.

10 Combinaciones de filtro 618 (excitación) / 660 (emisión) y 498 / 660.

	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo de espera (s)	Velocidad de cambio (°C/s)	Adquisición
Adquisición	1	40	10	4,8	única

Resultados

15 La señal de la excitación directa del primer pigmento (618 / 660) demuestra una correlación con las diferentes cantidades de componente A y la señal de la excitación mediante el pigmento no fluorescente (498 / 660) demuestra una correlación con la parte del componente B en presencia de una cantidad constante de componente A (ver las figs. 5 y 6).

20 Ejemplo 4

Utilización de dig / anti-dig como grupo de afinidad para los dos componentes

25 Con el fin de comprobar el rendimiento del concepto de control descrito con diversos grupos de afinidad, se utilizaron digoxigenina (DIG) y anticuerpo anti-digoxigenina (anti-DIG) como grupos de afinidad para los pigmentos JA286 y el pigmento no fluorescente (ver el Ejemplo 3): Para las mediciones, la solución se excitó a la longitud de onda de absorción del pigmento no fluorescente y se detectó la fluorescencia a la longitud de onda de emisión del pigmento aceptor.

30 Mezclas de componentes

- 35 A) B) Componente A concentrado 2 veces, que contiene:
DIG 4 µM marcado con el pigmento fluorescente de longitud de onda larga JA286 (Roche Applied Science, máximo de excitación a 686 nm, máximo de emisión a 703 nm; ver el Ejemplo 1), en Tris 10 mM, pH 8,3 y MgCl₂ 3 mM.
- B) C) Componente B concentrado 2 veces, que contiene:
anticuerpo anti-IDG 4 µM (Roche Applied Science) marcado con el pigmento no fluorescente (Roche Applied Science) en Tris 10 mM, pH 8,3, y MgCl₂ 3 mM.

40 Configuración de la placa de PCR multipocillo

Con el fin de demostrar el efecto de la falta de uno de los dos componentes de las soluciones de dos componentes en la medición de control, se pipetearon diferentes cantidades de componente A y componente B a pocillos de una placa de PCR de 384 pocillos (Roche Applied Science, nº de cat. 04729749001).

45

Nº de combinación	Componente A [µl]	Componente B [µl]
1	0	5
2	5	5
3	5	0

ES 2 392 238 T3

4	0	0
---	---	---

Se dispensó cada combinación en 10 posiciones de la placa de 384 pocillos, representando réplicas técnicas.

Protocolo

5 Se midió la fluorescencia en un instrumento LightCycler 480 (Roche Applied Science, nº de cat. 05015243001) a una temperatura constante.

10 Combinación de filtro: 498 (excitación) / 660 (emisión).

	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo de espera (s)	Velocidad de cambio (°C/s)	Adquisición
Adquisición	1	40	10	4,8	única

Resultados

15 En el caso de que se encuentren presentes los dos componentes en la mezcla, debido a la transferencia de energía desde el donador excitado hasta el pigmento aceptor, puede medirse una señal de fluorescencia que es significativamente superior a la señal de fondo que puede medirse en el caso de que se omita uno de los dos componentes (ver la fig. 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Composición de pigmento para el control de la transferencia de fluidos

<130> 2584/ EP2-HH

<150> 09005256.4

10 <151> 2009-04-09

<150> 09167190.4

<151> 2009-08-04

15 <160> 4

<170> Patent In versión 3.5

<210> 1

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador directo de GAPDH

<400> 1

agccacatcg ctcagacac 19

30 <210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador inverso de GAPDH

<400> 2

gccaatagc accaaatcc 19

40

<210> 3

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> oligo A de control (únicamente L-nucleótidos)

<400> 3

50 cccacatcga 10

<210> 4

<211> 10

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligo B de control (únicamente L-nucleótidos)

60 <400> 4

tcgatgtggg 10

REIVINDICACIONES

1. Kit para el control de las proporciones de composición, comprendiendo dicho kit:
- 5 a) un primer componente que comprende un primer pigmento que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para emitir radiación o para transferir energía a un segundo pigmento, y
- 10 b) un segundo componente que comprende un segundo pigmento que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo excitable dicho segundo pigmento por una segunda luz de excitación o por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento,
- caracterizado porque dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se configuran de manera que:
- 15 - dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y
- dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dichos pigmentos se activa tras la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
- 20 - una mezcla de dichos primer y segundo pigmentos emite radiación al ser excitada con dicha primera o dicha segunda luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dichos primer y segundo pigmentos.
2. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho primer pigmento es un pigmento fluorescente y dicho segundo pigmento es una molécula inhibidora, siendo dicha molécula inhibidora excitable mediante transferencia energética a partir de dicho pigmento fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicha molécula inhibidora impide la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente.
- 25 3. Kit según la reivindicación 2, en el que dicho pigmento fluorescente y dicha molécula de inhibidor son la misma molécula.
- 30 4. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho primer pigmento es un primer pigmento fluorescente y dicho segundo pigmento es un segundo pigmento fluorescente, presentando dicho segundo pigmento fluorescente un máximo de excitación a una longitud de onda más larga que dicho primer pigmento fluorescente y en el que dicho segundo pigmento fluorescente es excitable por la transferencia de energía a partir de dicho primer pigmento fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicho segundo pigmento fluorescente emite luz fluorescente que presenta una longitud de onda diferente de la longitud de onda de dicho primer pigmento fluorescente.
- 35 5. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho primer pigmento es un pigmento no fluorescente y dicho segundo pigmento es un pigmento fluorescente, siendo dicho pigmento fluorescente excitable mediante transferencia energética a partir de dicho pigmento no fluorescente con la unión de los grupos de afinidad, de manera que dicho pigmento fluorescente emite luz fluorescente.
- 40 6. Kit para el control de las proporciones de composición, comprendiendo dicho kit:
- 45 a) un primer componente que comprende un pigmento fluorescente que presenta un primer grupo de afinidad, siendo dicho primer pigmento excitable por una primera luz de excitación para transferir energía a una estructura aromática o heteroaromática, y
- 50 b) un segundo componente que comprende una estructura aromática o heteroaromática que presenta un segundo grupo de afinidad, siendo dicha estructura aromática o heteroaromática excitable mediante transferencia energética a partir de dicho primer pigmento, de manera que dicha estructura aromática o heteroaromática impide la emisión de fluorescencia de dicho pigmento fluorescente.
- 55 caracterizado porque dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática están configurados de manera que:
- 60 - dichos primer y segundo grupos de afinidad presentan afinidad de unión entre sí, en los que la transferencia de energía entre dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática se activa con la unión de dicho primer grupo de afinidad a dicho segundo grupo de afinidad, y
- dicho primer grupo de afinidad es un primer oligonucleótido y dicho segundo grupo de afinidad es un segundo oligonucleótido que es complementario a dicho primer oligonucleótido, en el que dichos oligonucleótidos están compuestos de L-nucleótidos, y
- 65 - una mezcla de dicho primer pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática emite radiación al ser excitada con dicha primera luz de excitación, en la que dicha radiación es una medida de la proporción de composición de dicho pigmento y dicha estructura aromática o heteroaromática.

7. Método de verificación de las proporciones de composición de dos componentes utilizando el kit según las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 a) mezclar los dos componentes, en el que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad, b) llevar a cabo una primera medición de la radiación con la excitación con luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento no se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad,
- 10 c) llevar a cabo una segunda medición de radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho primer pigmento y dicho segundo pigmento se encuentran unidos entre sí mediante dichos grupos de afinidad, y
- 15 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dichas primeras mediciones de la radiación de la etapa b) se llevan a cabo con dicho primer componente previamente a la mezcla de los dos componentes en la etapa a).
- 20 9. Método según las reivindicaciones 7 y 8, en el que dichas primeras mediciones de radiación de la etapa b) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho primer pigmento.
- 25 10. Método según la reivindicación 7, en el que dichas primeras mediciones de radiación de la etapa b) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho segundo pigmento.
- 30 11. Método según las reivindicaciones 7 a 10, en el que dichas segundas mediciones de radiación de la etapa c) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho segundo pigmento.
- 35 12. Método según las reivindicaciones 7 a 10, en el que dichas segundas mediciones de radiación de la etapa c) se llevan a cabo mediante la aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de la emisión de dicho primer pigmento.
- 40 13. Método de verificación de las proporciones de composición de dos componentes según las reivindicaciones 4 y 5, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 45 a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el primer pigmento que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende el segundo pigmento que presenta dicho segundo grupo de afinidad,
- 50 b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha primera medición de la fluorescencia se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho segundo pigmento y midiendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y
- 55 c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dichos primer y segundo pigmentos se encuentran unidos; dicha segunda medición de la fluorescencia se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho primer pigmento y midiendo la intensidad de emisión de dicho segundo pigmento, y
- 60 d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.
- 65 14. Método de verificación de las proporciones de composición de dos componentes utilizando el kit según la reivindicación 6, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) mezcla de dos componentes, en la que el primer componente comprende el pigmento fluorescente que presenta dicho primer grupo de afinidad y el segundo componente comprende la estructura aromática o heteroaromática que presenta dicho segundo grupo de afinidad,
- 60 b) llevar a cabo una primera medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha primera medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente,
- 65 c) llevar a cabo una segunda medición de la radiación tras la excitación por luz de excitación bajo condiciones en las que dicho pigmento fluorescente y dicha estructura aromática o heteroaromática no

se encuentran unidos entre sí mediante grupos de afinidad; dicha segunda medición de la radiación se lleva a cabo mediante aplicación de longitudes de onda de excitación específicas de dicho pigmento fluorescente y midiendo la intensidad de emisión de dicho pigmento fluorescente, y
d) comparar las dos mediciones de radiación de las etapas b) y c) con el fin de verificar la proporción de composición de dichos dos componentes.

5

15. Método según la reivindicación 14, en el que dichas primeras mediciones de la radiación de la etapa b) se llevan a cabo con dicho primer componente previamente a la mezcla de los dos componentes en la etapa a).

10

Fig. 1

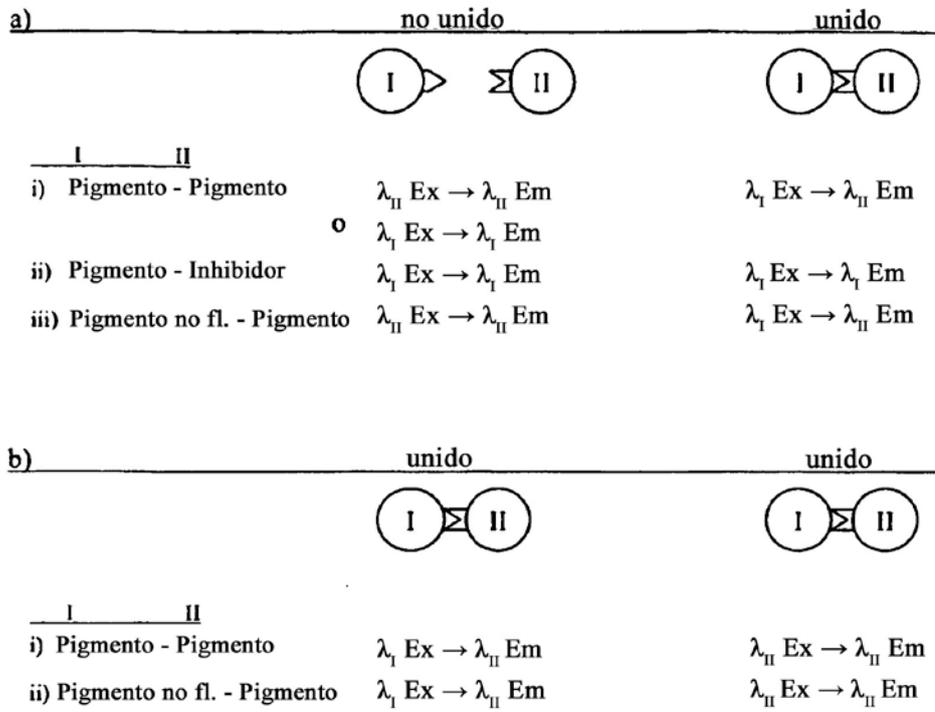


Fig. 2

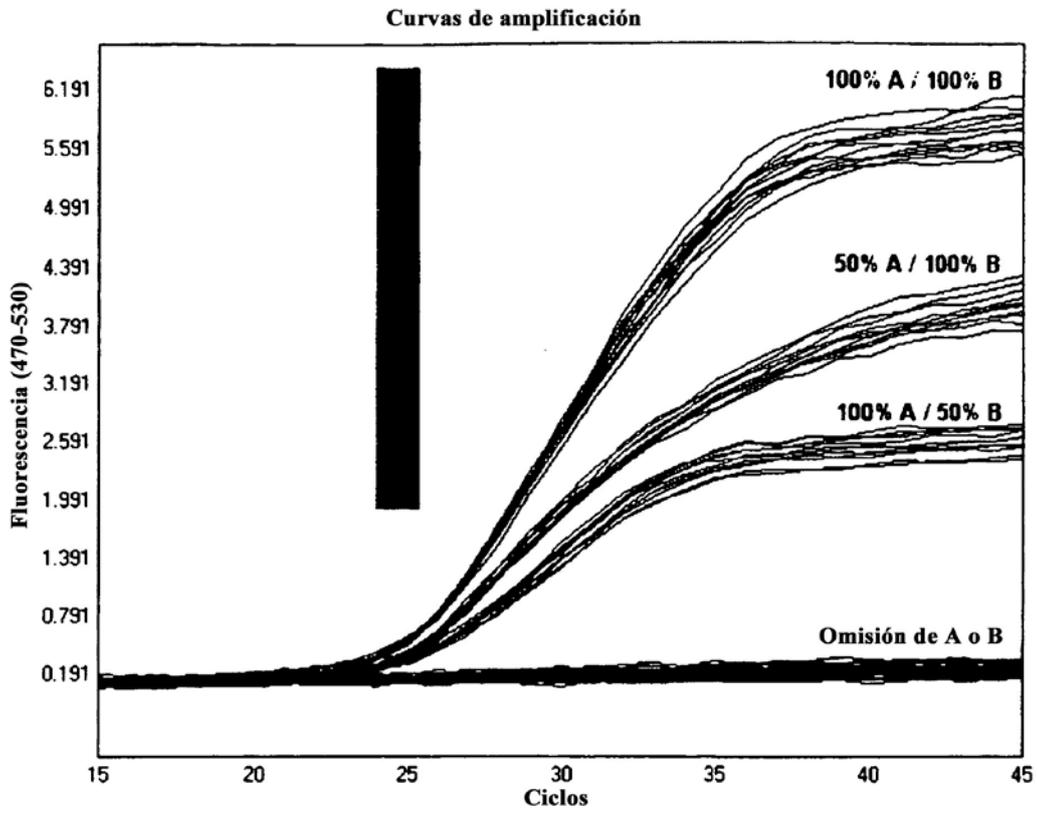


Fig. 3

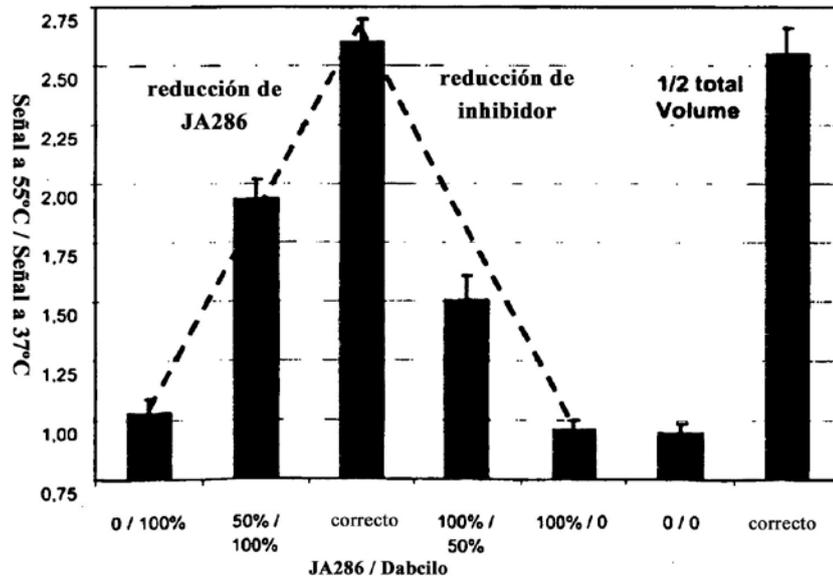


Fig. 4

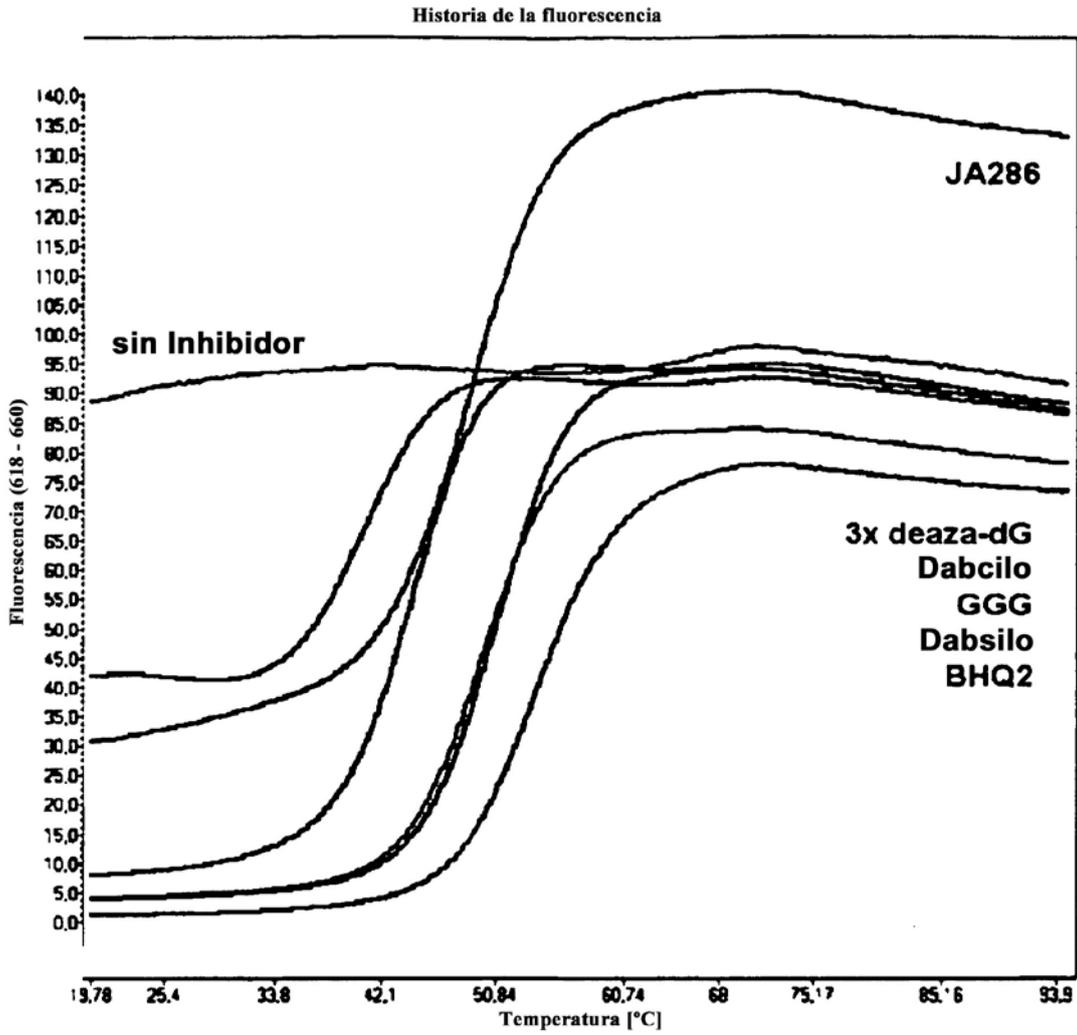


Fig. 5

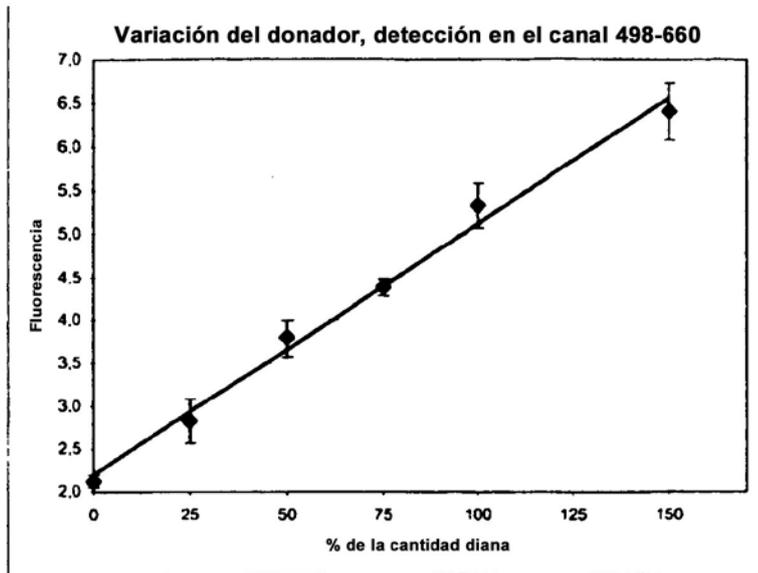


Fig. 6

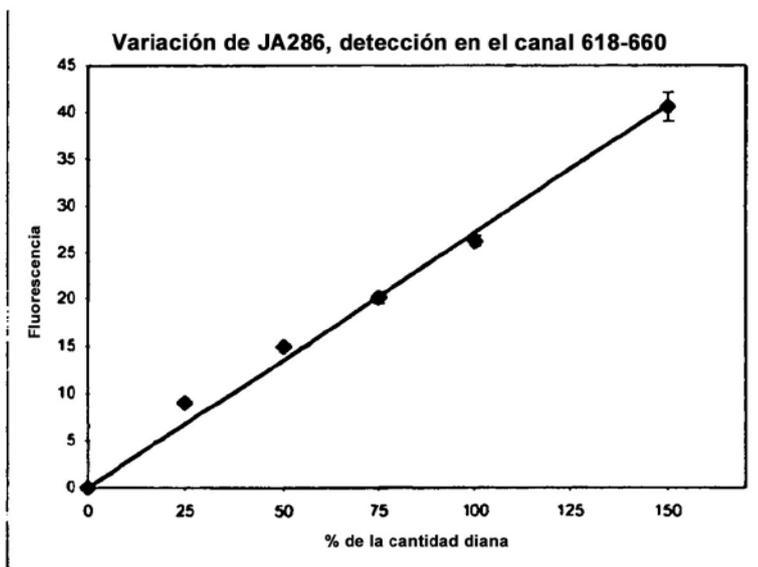


Fig. 7

