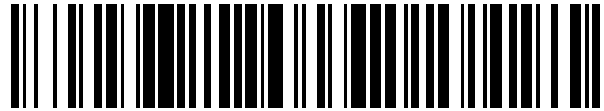


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 379**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.1998 E 06110485 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1666609**

54 Título: **Transferencia de energía fluorescente mediante hibridación competitiva**

30 Prioridad:

28.02.1997 US 39583 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.02.2013

73 Titular/es:

**QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS
INCORPORATED (100.0%)
300 DELAWARE AVENUE
WILMINGTON, DE 19899, US**

72 Inventor/es:

**CHIANG, CHIH-SHENG y
CUAN, JOSE F.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 396 379 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

Transferencia de energía fluorescente mediante hibridación competitiva

5 Alcance de la invención

Esta invención está relacionada con sondas complementarias de longitud desigual que tienen un fluoróforo en una sonda y un desactivador de fluorescencia en la otra. El fluoróforo y el desactivador se encuentran yuxtapuestos de tal forma que la proximidad del desactivador al fluoróforo desactiva la fluorescencia del fluoróforo. Estas sondas son
10 útiles en la detección de nucleótidos con complementariedad de secuencia. Las capacidades de detección residen en la hibridación competitiva resultante de la utilización de sondas de longitud desigual y la consiguiente disminución de la desactivación producida por esta hibridación competitiva.

15 Área de la Invención

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se han unido al conjunto de técnicas mediante las que se pueden aumentar cantidades muy pequeñas de nucleótidos hasta alcanzar una concentración que permita su detección por algún método. Hay diversas técnicas de amplificación que ya están disponibles. La técnica más extendida es la de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, como se la denomina comúnmente en la actualidad. Mientras las técnicas de amplificación aumentan el número de secuencias nucleotídicas diana disponibles para su detección, recuperación o uso, es necesario encontrar un método sensible para detectar el producto de amplificación. Además, las tecnologías de amplificación tienen la ventaja de disponer de un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación lo cual permite detectar series de amplificación no reactivas o ineficiencias del proceso. La cuantificación de la carga oligonucleotídica también se puede realizar mediante el seguimiento en tiempo real si éste puede llevarse a cabo sin interferir con la reacción de amplificación.
20
25

El procedimiento de esta invención se basa en la transferencia de energía fluorescente entre una sonda marcada con un fluoróforo y una sonda marcada con desactivador con complementariedad de secuencia entre ellas. Las sondas utilizadas son de longitud desigual favoreciendo así la hibridación de una sonda con la secuencia del ácido nucleico diana frente a la hibridación con su sonda complementaria. En ausencia de ácidos nucleicos con secuencias complementarias o idénticas a las secuencias de la sonda (secuencia diana), las dos sondas hibridarían entre sí. Cuando las dos sondas están hibridadas entre sí la proximidad del desactivador respecto al fluoróforo provoca la desactivación de la fluorescencia del fluoróforo. En presencia de ácido nucleico con secuencias complementarias o idénticas a la secuencia de la sonda, algunas de las sondas marcadas con fluoróforo hibridarán con el ácido nucleico de secuencia complementaria, serán separadas del desactivador y producirán una fluorescencia aumentada (activada). Esta diferencia de fluorescencia se puede utilizar para la detección específica de la presencia de ácidos nucleicos con las secuencias diana.
30
35

La patente US 5.565.322 está relacionada con sistemas de transferencia de energía basados en moléculas de ácidos nucleicos y en particular el ensamblaje de estructuras protónicas. Es una característica esencial de este documento que se utilice un oligonucleótido que comprende al menos dos cromóforos donadores en una distancia de transferencia donador-donador y un cromóforo aceptor que puede estar presente en la misma cadena, o alternativamente en un oligonucleótido separado. Además, este documento, muestra la utilización de una sonda desactivadora que desactiva la señal del cromóforo aceptor en ausencia de la diana. Este documento, no obstante, no tiene éxito en la descripción de (i) un método para monitorizar la amplificación de ácidos nucleicos y (ii) un grupo de sondas que consiste en un fluoróforo y una sonda-desactivadora que son complementarios entre ellos pero tienen una longitud diferente y forman un complejo que posee una temperatura de fusión seleccionada de forma que el complejo no se disocia durante la fase de hibridación del cebador en una reacción de PCR.
40
45

Este documento, WO 97/29210, describe un método para detectar un ácido nucleico diana durante una reacción de PCR mediante la utilización de dos sondas. La primera sonda posee un 5'-fluoróforo y la segunda sonda posee un 3'-desactivador que es complementario a la primera sonda. De acuerdo con este documento, ambas sondas difieren en su longitud de forma que su temperatura de fusión difiere en al menos 10°C y la T_m de la primera sonda es igual o superior que la de los cebadores de PCR, mientras que la T_m de la segunda sonda es inferior que la temperatura en la que tiene lugar la ciclación térmica de la PCR (es decir, por debajo de la T_m de los cebadores de la PCR). Esto posee el efecto que durante toda la reacción de PCR ambas sondas no están hibridadas entre ellas resultando en una fuerte fluorescencia de fondo que solamente puede desactivarse mediante el enfriamiento de la reacción de PCR por debajo de la T_m de la segunda sonda (es decir, parando de forma efectiva la ciclación térmica). Así, este documento, no permite debido al diseño de sus sondas monitorizar a tiempo real la reacción de amplificación.
50
55
60

La PE 0745690 describe sondas de hibridación unimoleculares y bimoleculares que comprenden una secuencia complementaria a la diana, una pareja de afinidad y una pareja de marcajes. Este documento, no logra describir dobletes de sondas que asemejen aquellas de las reivindicaciones anexadas, es decir, son complementarias entre ellas pero difieren en longitud por lo que la sonda más larga se une preferentemente a la diana por encima de la otra cadena de la sonda y posee una T_m que es superior que la temperatura de hibridación de la reacción de amplificación para poder permitir una detección de diana a tiempo real durante una reacción de amplificación que está en
65

marcha, dejando tan solo un método para monitorizar amplificación de ácidos nucleicos utilizando un doblete de sondas.

5 Ambas WO 96/34983 y US 5.538.848 están relacionadas con los métodos y reactivos que permiten la combinación de la amplificación y la detección (mediante la hibridación de una sonda). No obstante, ambas describen solamente sondas de cadena sencilla en las que el desactivador y el fluoróforo están acoplados a extremos opuestos de la misma sonda. Por lo tanto, estos documentos, no logran describir un doblete de sondas como el que se reivindica en las reivindicaciones anexadas.

10 Mötisson et al. (1989), está relacionada con la detección de ácidos nucleicos mediante la utilización de sondas de DNA que contienen marcaposibles sensibles a la hibridación. Este documento describe un doblete de sondas, en el que una cadena posee un 5'-fluoróforo y la otra cadena posee un 3'-desactivador de dicho fluoróforo. No obstante, este documento muestra una hibridación competitiva, es decir una técnica en la que la diana y la cadena de la segunda sonda compiten para unirse a la cadena de la primera sonda. Como las dos cadenas de la sonda son de la misma longitud, el doblete de sondas de D6 no satisface el criterio que una de las cadenas de las sondas se une preferentemente a la diana por encima de la otra cadena de la sonda. D6 tampoco logra en describir que la temperatura de fusión del complejo de sondas debe ser de 5 a 10°C superior que la temperatura de hibridación de una reacción de amplificación (PCR).

20 Resumen de la invención

En un primer aspecto, esta invención está relacionada con un método de seguimiento de la amplificación de ácidos nucleicos que comprende: la realización de la amplificación de un polinucleótido diana en la que la amplificación se lleva a cabo mediante cualquier método que utilice una primera sonda oligonucleotídica y una segunda sonda oligonucleotídica más corta en por lo menos dos pares de bases; la primera sonda presenta un fluoróforo; la segunda es complementaria de la primera sonda y presenta una molécula desactivadora capaz de desactivar la fluorescencia de dicho fluoróforo, estando este último y el desactivador unidos a sus sondas respectivas en una posición que provoca que la molécula desactivadora desactive la fluorescencia del fluoróforo cuando las sondas hibridan, caso en el que la sonda de mayor longitud se une preferentemente al polinucleótido diana y, cuando se encuentra en esta situación, la intensidad de fluorescencia del fluoróforo es mayor que la del fluoróforo cuando está hibridado con la segunda sonda; y el seguimiento de la fluorescencia del fluoróforo, siendo la generación de fluorescencia una consecuencia de la amplificación del ácido nucleico.

35 También está relacionada con un método de detección de la presencia de un polinucleótido diana mediante las sondas de longitud desigual.

Las sondas hibridadas con fluoróforo y desactivador también forman parte de esta invención.

40 Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la señal de fluorescencia obtenida a partir de una amplificación por PCR de RNA HVC diana utilizando sondas de longitud diferente. La sonda de mayor longitud contenía fluoróforo en el carbono 5' terminal y la sonda de menor longitud, preparada por delección de tres pares de bases del extremo 5' terminal de la sonda mayor, contenía un desactivador en el carbono 3' terminal.

45 Descripción detallada de la invención

Esta invención se utiliza junto con la amplificación de un polinucleótido diana mediante cualquier método. Estas técnicas de amplificación incluyen la PCR, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la «gap» LCR, la amplificación mediada por transcripción (TAM), la amplificación de ácidos nucleicos basada en la secuencia (NASBA) y la amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA).

55 La PCR es la técnica de mayor interés y aparece descrita en muchas referencias bibliográficas como por ejemplo Innis et al., editors, PCR Protocols (Academic Press, New York, 1989); Sambrook et al., Molecular Cloning, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); y similares. El sitio de unión de la sonda oligonucleotídica está situado entre los cebadores de PCR utilizados para amplificar el polinucleótido diana. Para llevar a cabo la PCR se puede utilizar cualquier polimerasa. Ya que la intensidad de la señal de fluorescencia se intensifica a medida que se generan más réplicas del polinucleótido diana, cualquier polimerasa que aumente el número de polinucleótidos diana servirá para este método. La PCR se lleva a cabo preferiblemente con la utilización de una polimerasa termoestable. La enzima preferida es una Taq DNA polimerasa, p. ej. Amplitaq™ (Perkin Elmer, Norwalk, Conn., EEUU) o una DNA polimerasa termoestable equivalente. La temperatura de hibridación de la PCR es de entre unos 5 y 10 °C por debajo de la temperatura de fusión de las sondas oligonucleotídicas empleadas. La polimerasa Pwo también se ha utilizado con éxito en esta invención.

65 El término «oligonucleótido» tal como se utiliza aquí incluye oligómeros lineales de monómeros o enlaces naturales o modificados, entre los que figuran desoxiribonucleósidos, ribonucleósidos y similares, capaces de unirse específica-

mente a un polinucleótido diana según un patrón regular de interacciones monómero a monómero, igual que el tipo de emparejamiento de bases propuesto por Watson y Crick o similar. Los monómeros se encuentran habitualmente unidos por enlaces fosfodiéster, o análogos de los mismos, para formar oligonucleótidos con un tamaño que oscila entre unas pocas unidades monoméricas, p. ej. 3 o 4, y varias decenas de unidades monoméricas. Siempre que se representa un oligonucleótido mediante una secuencia de letras, como «ATGCCTG», se sobreentiende que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha y que la «A» denota desoxiadenosina, la «C» denota desoxicitidina, la «G» denota desoxiguanosina y la «T» denota timidina, a no ser que se indique lo contrario. Algunos análogos de los enlaces fosfodiéster son fosforotioato, fosforoditioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. De forma general, las sondas oligonucleotídicas de la invención presentarán un número suficiente de enlaces fosfodiéster adyacentes a su extremo 5' de manera que la actividad exonucleasa 5'→3' empleada pueda degradar de forma eficiente la sonda unida para separar las moléculas desactivadora e indicadora.

La expresión «perfectamente emparejados» en referencia a un ácido nucleico bicatenario (dúplex) se refiere a que las cadenas poli u oligonucleotídicas que constituyen el dúplex forman una estructura de doble cadena en la que cada nucleótido de cada cadena presenta un emparejamiento de bases Watson-Crick con un nucleótido de la otra cadena. El término también engloba el emparejamiento de análogos de nucleósidos, como desoxinosina, nucleósidos con bases 2-aminopurina y similares, que pueden emplearse. De forma contraria, un malapareamiento en un dúplex entre un polinucleótido diana y una sonda oligonucleotídica o cebador significa que hay un par de nucleótidos en el dúplex que no consigue el enlace Watson-Crick.

Las sondas oligonucleotídicas de la invención pueden sintetizarse según diferentes aproximaciones, p. ej. Ozaki et al., *Nucleic Acids Research*, 20:5205-5214 (1992); Agrawal et al., *Nucleic Acids Research*, 18:5419-5423 (1990) o similares. Las sondas oligonucleotídicas de la invención se sintetizan convenientemente en un sintetizador de DNA automático, p. ej. un Sintetizador de DNA/RNA modelo 392 o 394 (Applied Biosystems, Inc. Foster City, Ca., EEUU), utilizando sustancias químicas estándar como la fosforamidita, revelada por ejemplo en las siguientes referencias: Beaucage and Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223-2311 (1992); Molko et al., Patente estadounidense núm. 4.980.460; Koster et al., Patente estadounidense núm. 4.725.677; Caruthers et al., Patente estadounidense números 4.415.732, 4.458.066 y 4.973.679, y similares. Se pueden utilizar sustancias químicas alternativas, que p. ej. dan lugar a grupos estructurales no naturales como el fosforotioato, fosforoamidato y similares, siempre y cuando no afecten negativamente a la eficiencia de hibridación de los oligonucleótidos resultantes o a la eficiencia de la escisión de la exonucleasa empleada. La longitud de la sonda oligonucleotídica está preferiblemente en un rango de 15 a 60 nucleótidos. De manera más preferible, esta longitud se encuentra entre los 18 y los 30 nucleótidos. La secuencia exacta y la longitud de la sonda oligonucleotídica de la invención depende en parte de la naturaleza del polinucleótido diana al que se une. La posición y la longitud de la unión se puede variar para conseguir las propiedades de hibridación y de fusión adecuadas para una realización determinada. El nucleótido del extremo terminal 3' de la sonda oligonucleotídica se encuentra preferiblemente bloqueado de manera que una polimerasa de ácido nucleico no pueda expandir la secuencia. Este bloqueo se realiza convenientemente adjuntando una molécula indicadora o desactivadora al carbono 3' terminal de la sonda oligonucleotídica mediante una porción de unión. Preferentemente las moléculas indicadoras son derivados de colorantes orgánicos fluorescentes destinados a unirse al carbono 3' terminal o al 5' terminal de la sonda a través de una porción de unión. Las moléculas desactivadoras también son preferentemente colorantes orgánicos, fluorescentes o no dependiendo de la realización de la invención. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la molécula desactivadora es fluorescente. En general, tanto si la molécula desactivadora es fluorescente como si simplemente libera la energía transferida desde el indicador mediante degradación no radiactiva, la banda de absorción del desactivador debería superponerse de manera considerable a la banda de emisión fluorescente de la molécula indicadora. Las moléculas desactivadoras no fluorescentes que absorben la energía de moléculas indicadoras excitadas, pero que no liberan la energía de manera radiativa, aquí se denominan como moléculas cromogénicas. Se puede encontrar una gran cantidad de consejos prácticos en las publicaciones especializadas para seleccionar los pares de indicador-desactivador adecuados para determinadas sondas. Un ejemplo son las siguientes referencias: Clegg "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids", *Methods of Enzymology*, 211: 353-389 (1992); Wu et al "Resonance energy transfer: methods and applications", *Anal.Biochem.* 218: 1-13 (1994); Pesce et al., editors, *Fluorescence Spectroscopy* (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., *Fluorescence Analysis: A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, 1970) y similares. Las publicaciones también incluyen referencias que proporcionan listados exhaustivos de moléculas fluorescentes y cromogénicas y de sus propiedades ópticas relevantes para la elección de los pares indicador-desactivador, p. ej. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, *Colour and Constitution of Organic Molecules* (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, *Indicators* (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, *Fluorescence and Phosphorescence* (Interscience Publishers, New York, 1949) y similares. Además, se puede encontrar amplia orientación acerca de la obtención de derivados de moléculas desactivadoras e indicadoras para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes que se pueden añadir a un oligonucleótido. Un ejemplo son las siguientes referencias: Haugland (citado anteriormente); Ullman et al, Patente estadounidense núm. 3.996.345; Khanna et al., Patente estadounidense núm. 4.351.760 y similares.

Se pueden seleccionar pares ejemplares de indicador-desactivador a partir de colorantes derivados de xanteno, fluoresceínas incluidas, y colorantes derivados de la rodamina. Muchas formas apropiadas de estos compuestos están disponibles comercialmente con sustituyentes en sus fracciones fenilo aptos para ser utilizados como el sitio de unión

o como el lugar funcional de enlace para la unión con un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que presentan un grupo amino en la posición alfa o beta. Dentro de estos compuestos naftilamino se encuentran los siguientes: 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalenosulfonato y 2-p-touidínil-6-naftalenosulfonato. Otros colorantes son: 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina, N-(p-(2-benzoxazolil)-fenil)-maleimida, benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos y similares. Preferiblemente las moléculas indicadoras y desactivadoras son seleccionadas a partir de la fluoresceína y de colorantes derivados de rodamina. Estos colorantes y los métodos de enlace adecuados para la unión a oligonucleótidos están descritos en muchas referencias, p. ej. Khanna et al. (citado anteriormente); Marshall, *Histochemical J.*, 7:299-303 (1975); Menchen et al., Patente estadounidense núm. 5.188.934; Menchen et al., Patente europea núm. de solicitud 87310256.0 y Bergot et al., Solicitud internacional PCT/US90/05565. Los últimos cuatro documentos se adjuntan de este modo mediante cita.

Existen muchas fracciones de unión y metodologías para unir moléculas indicadoras o desactivadoras a los extremos 5' o 3' terminales. Ejemplos de esto mismo se encuentran en las siguientes referencias: Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al, *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (grupo 3' tiol sobre el oligonucleótido); Sharma et al, *Nucleic Acids Research*, 19:3019(1991) (3' sulfhidrilo); Giusti et al., *PCR Methods and Applications*, 2:223-227 (1993) y Fung et al., Patente estadounidense núm. 4.757.141 (grupo 5' fosfoamino mediante Aminolink™. II comercializada por Applied Biosystems, Foster City, Ca, EEUU); Stabinsky, Patente estadounidense núm. 4.739.044 (grupo 3' aminofosforilo); Agrawal et al. *Tetrahedron Letters*, 3:1543-1546 (1990) (unión mediante enlaces fosforamidato); Sproat et al, *Nucleic Acids Research*, 15:4837 (1987) (grupo 5' mercapto); Nelson et al, *Nucleic Acids Research*, 17:7187-7194 (1989) (grupo 3' amino) y similares. Es preferible emplear fracciones de unión comercializadas que puedan unirse a un oligonucleótido durante la síntesis, p. ej. comercializadas por Clontech Laboratories (Palo Alto, Ca, EEUU).

Los colorantes de rodamina y fluoresceína también se unen de manera conveniente al hidroxilo 5' de un oligonucleótido al final de la síntesis en fase sólida mediante colorantes derivados con una fracción fosforamidada, p. ej. Woo et al., Patente estadounidense núm. 5.231.191 y Hobbs, Jr., Patente estadounidense núm. 4.997.928.

El técnico tiene la libre elección de seleccionar los cebadores y sondas utilizados en esta invención. Esta invención no establece ningún requisito o restricción especial acerca de la elección del cebador o de la sonda. Estas elecciones pertenecen al dominio de la técnica.

Las sondas pueden ser de cualquier longitud siempre y cuando esta permita llevar a cabo la invención. Como línea de partida la sonda de mayor longitud debe tener por lo menos tres pares de bases, a nivel práctico la sonda de mayor longitud estará constituida por más de tres pares de bases. Sin embargo, no existe un límite superior ocasionado por el uso de la FETCH. La longitud de la sonda mayor no viene indicada por la aplicación de la FETCH ya que funcionará con una sonda de cualquier longitud, siempre que cumpla el requisito de tener una longitud de por lo menos tres pares de bases. A nivel práctico, la sonda mayor tendrá una longitud que asegure su hibridación exclusiva con el polinucleótido diana y la sonda menor. La sonda menor tendrá por lo menos dos pares de bases menos que la sonda mayor. Esto constituye la norma básica para crear la sonda de menor longitud. Por lo que respecta a la diferencia de longitud entre las sondas se ha encontrado que se puede conseguir un buen acoplamiento mediante el cálculo de la temperatura de disociación de las sondas hibridadas. Por regla general la temperatura de disociación de los cebadores debe ser mayor que unos 55 °C y menor que 90 °C. Un método accesible para realizar este cálculo consiste en utilizar el software llamado Gene Runer (Hastings Software, Inc.), por ejemplo la versión 3.04.

El gen de menor tamaño puede prepararse en forma de gen truncado en 5' del gen mayor. O también en forma de gen truncado en 3'. Una tercera opción es la de crear la sonda de menor tamaño al truncar tanto el extremo 5' como el 3' del gen mayor. Cualquiera de estas tres formas de la sonda más corta servirán. A pesar de que se pueden utilizar dos o más formas truncadas, es más sencillo utilizar una forma, preferiblemente la truncada en 5'.

El fluoróforo y el desactivador se pueden situar en cualquier combinación de pares de bases siempre y cuando la fluorescencia del fluoróforo sea desactivada de forma efectiva por el desactivador cuando hibridan las dos sondas. El sistema más sencillo consiste en introducir el fluoróforo en el nucleótido 5' terminal de la sonda de mayor longitud y el desactivador en el nucleótido 3' terminal de la sonda de menor longitud. De esta manera se puede optimizar el efecto de las moléculas desactivadoras sobre la fluorescencia del fluoróforo. Las moléculas de fluoróforo y desactivadoras se encuentran preferiblemente unidas al carbono 5' terminal y al carbono 3' terminal de la sonda a través de porciones de unión 5' y 3'. Sin embargo, se ha demostrado, con al menos una cierta cantidad de los fluoróforos utilizados aquí, que el fluoróforo y el desactivador pueden situarse distantes entre sí y todavía ser funcionales. Véase por ejemplo la Patente estadounidense núm. 5.538.848, que revela que un fluoróforo y un desactivador pueden estar separados por varios nucleótidos. La patente revela un trabajo en el que un fluoróforo y un desactivador están separados por al menos 15 nucleótidos o más y supuestamente demuestra su utilidad. De igual forma, en el caso que nos ocupa se permite una separación entre el fluoróforo y el desactivador de varios nucleótidos, siempre que esta separación no reduzca de forma importante la capacidad del desactivador de actuar sobre la señal del fluoróforo cuando las dos sondas están hibridadas. El fluoróforo y/o el desactivador podrían estar unidos a un nucleótido del interior de las sondas, por supuesto, pero por razones de facilidad de síntesis y para optimizar la hibridación de sonda con diana y sonda con sonda, es preferible colocar el fluoróforo y el desactivador en los extremos 5' y 3' terminales de las son-

das, como se ha indicado anteriormente. De hecho, si tanto el fluoróforo como el desactivador están en los nucleótidos 5' o 3' terminales de sus respectivos oligonucleótidos el ensayo será funcional. Una disposición alternativa es colocar el fluoróforo en la sonda más corta y el desactivador en la más larga. De nuevo, en esta disposición la sonda más larga se unirá a la diana de forma preferente por lo que quedará suficientemente separada de la sonda con el fluoróforo y de este modo no podrá desactivar su fluorescencia de manera efectiva. La construcción preferida, sin embargo, consiste en disponer el fluoróforo en la sonda más larga.

El ensayo se puede optimizar variando la proporción de las sondas entre la de desactivador y la de fluoróforo. Una relación de 1:1 dio buenos resultados, pero se encontró que una relación 2:1 de la sonda con desactivador respecto a la sonda con fluoróforo daba mejores resultados. Mientras este aspecto de la invención no se ha optimizado, a pesar de haberse encontrado, un experto en la materia podrá optimizar un determinado ensayo mediante pruebas rutinarias con proporciones diferentes.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no pretenden, ni deben entenderse así, limitar el alcance de la invención reivindicada en manera alguna.

Ejemplos

Descripción general

El uso de transferencia de energía fluorescente mediante hibridación competitiva (FETCH) se desarrolló como un ensayo para la detección mediante PCR del virus de la hepatitis C (VHC) en especímenes humanos. La sonda directa, la más larga, incluía un colorante 6-FAM (carboxifluoresceína) en la posición 5' y un grupo fosfato en la posición 3' (para evitar la extensión durante la PCR). La sonda inversa, la más corta, incluía un colorante TAMRA (N,N,N',N' tetrametil-6-carboxirodamina) en la posición 3' (como no presenta un OH 3' no es posible la extensión durante la PCR). Se utilizó como fluoróforo FAM, un colorante fluorescente frecuentemente utilizado. Como desactivador en este caso se utilizó TAMRA, un colorante fluorescente con una banda de absorción que se superpone a la banda de emisión del FAM.

Ejemplo 1

Selección de los cebadores y sondas

A partir de trabajos publicados se identificaron secuencias polinucleotídicas del VHC. Para poder tener un ensayo que pudiera comprender todas las cepas conocidas del VHC, se seleccionaron dos cebadores y dos sondas cuyas secuencias polinucleotídicas eran comunes a todas las secuencias de RNA de cepas descritas. Se seleccionaron los cebadores para que hibridaran con todas las cepas conocidas de VHC y poseyeran unas características satisfactorias como una temperatura de disociación similar, una complementariedad 3' no extensiva entre ellas, etc. Los cebadores escogidos, tal como se describe en las publicaciones, rodean un segmento de 254 pb de la región no codificante 5' del VHC desde el nucleótido número 3290 hasta el 3543. Los datos de secuencia del VHC dependían de los cebadores y las sondas seleccionadas que se identifican en las siguientes tablas I-II y IV (adjuntas).

Tabla II

OLIGO	SECUENCIA CEBADOR DIRECTO	BASES	PM	MARCADOR
HCV	5'GCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCT	26	8008	Ninguno
OLIGO	SECUENCIA CEBADOR INVERSO	BASES	PM	MARCADOR
HCVR2	5'GGTGCACGGTCTACGAGACC3'	20	6124	Ninguno

Tabla III

SECUENCIA DIANA 3331-3350	
Sonda C1	5'FAM CCGGGAGAGAGCCATAGTGGTC PO4
Sonda C2	3'TAMRA GGCCCTCTCGGTATCAC

La presentación poco convencional de la secuencia de C2 (desde 3' hasta 5') facilita la visualización de su complementariedad con C1.

Tabla IV

	BASES	PM	MARCADOR
Sonda C1	20	6914	6-FAM
Sonda C2	17	6065	TAMRA

Cálculo de los pesos moleculares mediante Gene Runer, versión 3.04 (Hastings Software, Inc.)

Ejemplo 2

Síntesis de las sondas

Se sintetizaron por encargo dos sondas en TriLink Biotechnologies, Inc. (11585 Sorrento Valley Rd., Suite 105, San Diego, CA 92121). Se prepararon de la siguiente manera:

5 Paso 1. Síntesis del oligonucleótido

El oligonucleótido se preparó en un soporte que bajo desprotección producirá un grupo fosfato 3' (Glen Research Catalog núm. 20-2913).

10 Paso 2. Adición de 6-FAM

El oligonucleótido unido al soporte se hizo reaccionar manualmente con 15 equivalentes de amidita 6-FAM (Glen Research Catalog núm. 10-5901) para asegurar una alta eficiencia.

15 Paso 3. Desprotección del oligonucleótido

El oligonucleótido marcado con FAM se desprotegió durante 36 horas a temperatura ambiente con hidróxido amónico fresco concentrado. Tras la desprotección se decantó el reactivo, se aclararon las partículas magnéticas y se secaron las soluciones combinadas.

20 Paso 4. Purificación

El oligonucleótido marcado con FAM se purificó mediante HPLC de fase inversa. El FAM solo se encontraba en el material de longitud completa y constituía un asa lipofílica útil permitiendo una buena separación. Tras la purificación, se secó el compuesto para su precipitación. Se precipitó el compuesto a partir de NaOAc 0,3 M utilizando EtOH. Se recuperó el producto mediante centrifugación de alta velocidad y se lavó dos veces con EtOH.

25 Paso 5. Análisis final

30 El producto seco se resuspendió en agua, se cuantificó y se analizó su pureza con HPLC. Luego, el compuesto se secó de nuevo para prepararlo para su administración.

Ejemplo 3

35 Detección de RNA de VHC mediante PCR-transcriptasa inversa utilizando FETCH

El ensayo se llevó a cabo en forma de una reacción en cadena de la polimerasa y transcripción inversa de un solo paso. Se aisló y purificó RNA de VHC a partir de suero o plasma humanos. Se realizó un lisado de la muestra de suero o plasma bajo condiciones altamente desnaturizantes para desactivar las RNAsas y asegurar el aislamiento del RNA intacto. Se precipitó el RNA con etanol y se transfirió a una columna spin QIAmp (Qiagen, Chatsworth, CA, EEUU) de unión a RNA. Entonces se lavó la columna y el RNA se eluyó con agua. El molde de RNA purificado (10 µl) se mezcló con mezcla de reacción de VHC (véase la tabla V)(40 µl) y luego se llevó a cabo su transcripción inversa a DNA, se amplificó mediante PCR y se detectó mediante el sistema de análisis de secuencias Perkin Elmer 7700 en el mismo tubo utilizado para la tabla VI. Durante la PCR, algunas de las sondas marcadas con FAM y algunas de las marcadas con TAMRA hibridaron con el producto de la PCR por lo que redujeron la desactivación de la fluorescencia de FAM y permitieron la detección de la fluorescencia aumentada. La fluorescencia de FAM aumenta con el número creciente de ciclos de termociclado, lo que corresponde a los aumentos en la cantidad de producto de PCR, como ilustra la figura 1.

50 Tabla V

Mezcla de reacción de VHC típica		
Reactivos	1 tubo µl	Conc. final (40 µl)
Agua libre de RNasa	26,8	---
Tampón 10X TaqMan™	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	5	2,5 mM
dNTP5 (25 mM cada uno)	0,6	300 mM
Cebador HCVC1 (100 µM)	0,25	500 nM
Cebador HCVC2 (100 µM)	0,25	500 nM
Sonda C1 (25 µM)	0,2	100 µM
Sonda C2 (25 µM)	0,2	100 µM
Inhibidor de RNasa (20 U/µl)	0,5	10 U
MU/V RT(50 U/µl)	0,5	25 U
Amplitaq Gold (5 U/µl)	0,5	2,5 U

TaqMan es la marca registrada de Roch Molecular Systems, Inc.

ES 2 396 379 T3

Tabla VI

Ciclo	Temperat.	Tiempo	Repet.	T. de incremento de temp.	Autoincre-mento
Espera	48:00	60:00		Auto	
Espera	95:00	10:00		Auto	
Ciclo	93:00	0:15	40	Auto	
	57:00	0:30			
	72:00	0:30			

Tabla I

		CV 035EO									
N	61	71	81	91	1	11	21	31			
3151	SGDIYHSYS	HARPRWFVC	LLLLAAGVGI	YLLPNRBASE	ONTACGTRIG	INGCCAGGCC	CCTGATGGGG	GCGACACTCC	ACCATGAATC		
N	51	61	71	81	91	1	11	21			
3241	ACTCCCCCTGT	GAGGAACTAC	TGTCITCAG	CAGAAAGCOT	CTAGCCATGG	CGTTAGTATG	AGTGTGCTGC	AGCCTCCAGG	ACCCCCCCTC	329	
N	41	51	61	71	81	91	1	11			
3331	F CCGGGAGAGC	CATAGTGTGC	TGGGAAACCG	GTGAGTACAC	CGGAATTGCC	AGGACGACCG	GGTCCCTTCT	TCGATAAACCC	CGCTCAATGC		
Cebador F											
N	31	41	51	61	71	81	91	1	11		
3421	CTGGAGATT	GGGGTGGCCC	CCGCAAGACT	GCTAGCCGAG	TAGTGTGGG	TCGGGAAAGG	CCTTGTGGTA	CTCCCTGATA	GGGTGCTTGC		
N	21	31	41	51	61	71	81	91			
3511	GAGTGCCCCG	GGAGTCTCG	TAGACCCTGC	ACCATGAGCA	CGAATCCTAA	ACCTCAAAGA	AAAACCAAAC	GTAACACCAA	CCGTCCGCCA		
Cebador R											

Sondas (C1, C2)

REIVINDICACIONES

1. Un método de seguimiento de la amplificación de ácidos nucleicos que comprende lo siguiente:
- 5 llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos sobre un polinucleótido diana utilizando cualquier método, donde dicha amplificación se lleva utilizando
- una primera sonda oligonucleotídica, y
- 10 una segunda sonda oligonucleotídica con una molécula desactivadora capaz de desactivar la fluorescencia del fluoróforo mencionado,
- en el que el fluoróforo y el desactivador están unidos a sus sondas respectivas en unas posiciones que resultan en la desactivación de la fluorescencia del fluoróforo mediante la molécula desactivadora cuando las dos sondas están
- 15 hibridadas entre sí,
- en el que la segunda sonda de oligonucleótido que es complementaria a la primera sonda de oligonucleótido, es al menos dos pares de bases más corta que la primera sonda de oligonucleótido, y en el que las sondas se seleccionan de forma que la Tm del complejo de la sonda de oligonucleótido es entre 5 y 10°C superior a la temperatura de hibridación de la reacción de amplificación monitorizada, y
- 20 en el que la primera sonda de oligonucleótido se une preferentemente al ácido nucleico diana sobre la segunda sonda de oligonucleótido con el efecto que la fluorescencia del fluoróforo es superior cuando la primera sonda de oligonucleótido hibrida con el ácido nucleico diana que cuando hibrida con la segunda sonda de oligonucleótido, y
- 25 monitorizar la fluorescencia del fluoróforo, la generación de fluorescencia que corresponde a la presencia de ácidos nucleicos diana;
- en el que el método de amplificación es la PCR.
- 30
2. El método de la reivindicación 1, en el que el fluoróforo está en el nucleótido terminal 5' de la primera sonda y la molécula desactivadora está en el extremo terminal 3' de la segunda sonda.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fluoróforo se encuentra en el nucleótido terminal 3' de la primera sonda y la molécula desactivadora está en el extremo terminal 5' de la segunda sonda.
- 35
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda sonda es complementaria de la primera sonda acortada por la delección de tres o más nucleótidos 5' terminales.
- 40
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda sonda es complementaria de la primera sonda acortada por la delección de tres o más nucleótidos 3' terminales.
- 45
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda sonda es complementaria de la primera sonda acortada por la delección de tres o más nucleótidos 5' terminales y la delección de uno o más nucleótidos 3' terminales.

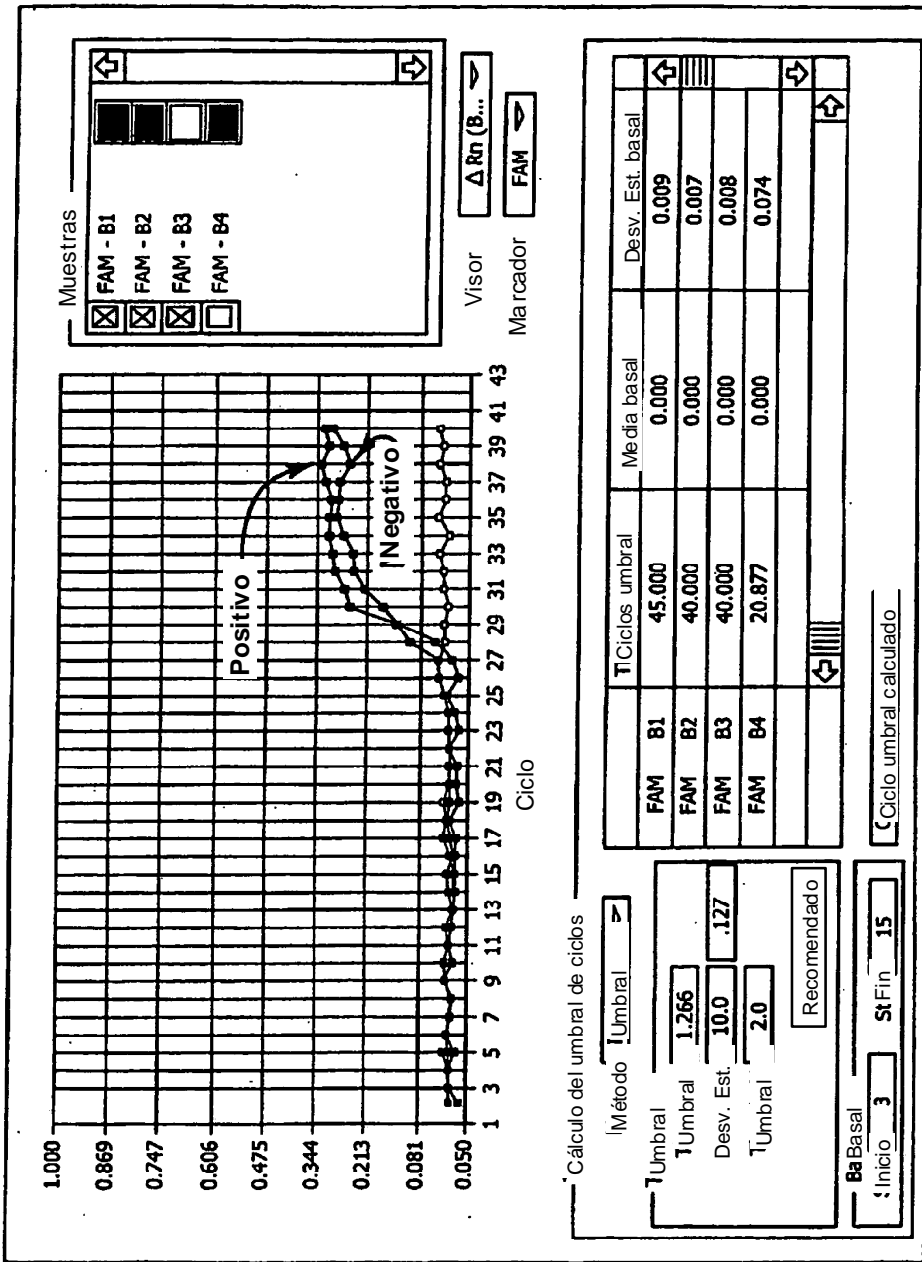


FIG. 1