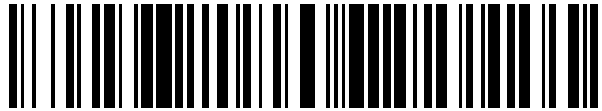


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 625**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08868164 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2225393**

54 Título: **Método para hibridar ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**27.12.2007 EP 07025148
27.12.2007 US 9145 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2015

73 Titular/es:

**POLYPLUS TRANSFECTION (33.3%)
BIOPARC - BP 90018 BOULEVARD SEBASTIEN
BRANDT
67401 ILLKIRCH CEDEX, FR;
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LENNE, NATHALIE y
ERBACHER, PATRICK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 537 625 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para hibridar ácidos nucleicos

5 La solicitud se refiere a la hibridación de ácidos nucleicos con conjugados de oligonucleótido-oligocación usados para manipular, aislar, detectar o amplificar ácidos nucleicos y la aplicación de los mismos en el campo de la biología molecular y de diagnóstico.

Las tecnologías a base de ácidos nucleicos se usan ampliamente en investigación celular y molecular y en diagnóstico. Las técnicas se basan en el reconocimiento de la secuencia entre un oligonucleótido sintético y su hebra de ácido nucleico complementaria. La afinidad y especificidad son dos características importantes que determinan la eficiencia de cualquier ensayo a base de hibridación nucleica.

10 Se han desarrollado diferentes enfoques para mejorar la hibridación de ácidos nucleicos.

Potier et al. 2000 se refieren a la síntesis y a las propiedades de hibridación de oligonucleótidos que contienen poliaminas en la posición C-2 de purinas (Chem. Eur. J. 6(22): 4188-4194). Ching-Hsuan Tung et al. 1993 se refieren a oligonucleótidos enlazados a poliaminas para la formación de la triple hélice del ADN (Nucleic Acids Research 21(23): 5489-5494).

15 Sun et al. 1996 se refieren a la síntesis de oligo-ADN sujeto mediante espermina C-ramificada, y a la estabilidad térmica de los dúplex y triplex (Tetrahedron 52(37): 12775-12290).

20 Entre ellos, uno es disminuir la repulsión electrostática entre hebras de ácidos nucleicos negativamente cargadas. Recientemente, en el documento WO 2007/069092 se describió una síntesis en fase sólida automatizada que consiste en injertar grupos catiónicos en los oligonucleótidos y que se basa totalmente en la química de fosforamido usada para la síntesis de oligonucleótidos. Se mostró que los conjugados resultantes de oligonucleótido-oligocación estabilizan la hibridación con una secuencia complementaria corta disminuyendo las repulsiones de fosfato entre hebras (Pons et al., 2006). Noir et al. 2008 se refieren a la temperatura de hibridación de conjugados de oligonucleótido-oligoespermina (ácidos nucleicos Zip) (J. Am. Chem. Soc. 130: 13500-13505).

25 Al igual que buscar una aguja en un pajar, la mejora de la detección específica de una secuencia única en una muestra biológica de ácido nucleico compleja, tal como un genoma total, es un reto más difícil. En tal situación, se podría esperar que la parte catiónica del conjugado de oligonucleótido-oligocación se pegue de forma no específica a grupos fosfato de ADN genómico, disminuyendo de ese modo el reconocimiento específico de la secuencia buscada. Esta preocupación se puede agudizar más cuando el polication es una poliamina, como se ejemplifica en el documento WO 2007/069092 y en (Pons et al., 2006). De hecho, las poliaminas tales como espermina o espermidina interactúan de forma natural con ADN genómico en células procariontas y eucariotas (repasado en Tabor y Tabor, 1984; Pegg et al., 1986). Además, se establece que la afinidad de unión y la especificidad de la secuencia se correlacionan generalmente de forma negativa, debido al mecanismo que gobierna la interacción del emparejamiento de bases de los ácidos nucleicos (Demidov y Frank-Kamenetskii, 2004). En consecuencia, se espera que los conjugados de oligonucleótido-oligocación usados para buscar una secuencia específica en un genoma completo toleren desemparejamientos, dando como resultado una disminución de la especificidad.

30 La solicitud describe el hallazgo inesperado de que una selección específica de conjugados de oligonucleótido-oligocación a partir de moléculas descritas en el documento WO 2007/069092 demuestra una afinidad muy elevada y sorprendentemente una estricta especificidad por su secuencia diana, dando como resultado una mejora general de los métodos a base de hibridación. Se mostró particularmente que dichos conjugados de oligonucleótido-oligocación mejoran la reacción en cadena de la polimerasa.

40 De forma ventajosa, dichos conjugados de oligonucleótido-oligocación son particularmente eficientes en comparación con oligonucleótidos estándar como cebadores y sondas. "Oligonucleótidos estándar" designa oligonucleótidos sin modificar que contienen nucleobases naturales.

45 Un objeto de la solicitud es proporcionar entonces un método de hibridación que usa conjugados específicos de oligonucleótido-oligocación a fin de seleccionar ácidos nucleicos.

Otro objeto de la solicitud se refiere al uso de los conjugados de oligonucleótido-oligocación como cebadores o sondas.

Todavía según otro objeto, la solicitud se refiere a las aplicaciones biológicas de dichos conjugados.

50 El método para detectar, aislar, amplificar o manipular un ácido nucleico diana en una muestra mediante hibridación con un conjugado de oligonucleótido-oligocación comprende permitir que dicho ácido nucleico reaccione con un conjugado de oligonucleótido-oligocación que comprende al menos restos A_i y B_j enlazados juntos directamente o vía un ligador, en el que

· A_i es un oligonucleótido i-mero, con $i = 3$ a 50 , en el que A_i es un oligómero con nucleobases de origen natural o no natural y/o grupos pentafuranosilo y/o enlaces de fosfodiéster nativos, que comprende

opcionalmente un grupo marcador

· B_j es un resto oligocatiónico orgánico j-mero, con j = 1 a 50, en el que B es

- HPO₃-R₁-(NH-R₂)_n-NH-R₃-O-, en el que R₁, R₂ y R₃ son alquileo inferior, idéntico o diferente, siendo los restos NH-R₂ idénticos o diferentes cuando n es >1;

5 - HPO₃-R₁-CH(X)-R₃-O-, en el que R₁ y R₃, idénticos o diferentes, son alquileo inferior, y X es putrescina, espermidina o un resto de espermina.

“Alquileo inferior”, como se usa en la descripción y en las reivindicaciones, designa un radical alquileo lineal, ramificado o cíclico, de C1-C6 opcionalmente sustituido.

10 A_i se selecciona del grupo que comprende desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y nucleobases de origen no natural tales como nucleótidos bloqueados (LNA), PNA así como sus modificaciones químicas o sustituciones tales como grupos fosforotioato (también denominado tiofosfato), 2'-fluoro o 2'-O-alquilo.

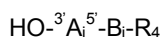
A_i puede comprender un grupo cromóforo/fluoróforo y/o un grupo desactivador, o un resto químico tal como un modificador amino o tiol, grupo espaciador, biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, grupo fosfato, o azúcar.

15 En una primera realización, un grupo -OH libre está presente en la posición 3' de A_i. De este modo, el conjugado de oligonucleótido-oligocación es útil como sustrato para ADN o ARN polimerasas.

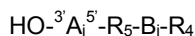
En esta primera realización, el conjugado de oligonucleótido-oligocación es de este modo útil como un cebador para la síntesis de ácidos nucleicos.

Los conjugados mixtos de oligonucleótido-oligocación según dicha primera realización tienen

20 estructura I



o estructura II



o estructura III

25 $\text{HO-}^3\text{A}_{i1}^5\text{-B}_j\text{-A}_{i2}\text{-R}_4$

en las que

- A_{i1} y A_{i2}, idénticos o diferentes, son como se definen anteriormente para A_i; estando A_{i2} orientado 3'-5' o 5'-3',

30 - R₄ es H o un ligador, un desactivador, un marcador tal como un grupo cromóforo o fluoróforo, o un resto químico tal como biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, azúcar o grupo fosfato;

- R₅, diferente de H, A_i y B_j, es un ligador entre A_i y B_j, y consiste en un ligador químicamente estable o escindible.

La solicitud se refiere así a un método tal como se define anteriormente, en el que una molécula de estructura I, II o III se usa como cebador tras la unión a un ácido nucleico diana.

35 Tal método comprende ventajosamente las etapas de:

- incubar un cebador tal como se describe anteriormente con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan que dicha molécula cebadora se una a dicha molécula de ácido nucleico diana, y

- extender dicho cebador con dicha molécula de ácido nucleico diana como molde.

40 En dicha realización, dichas moléculas son sustratos para una ADN o ARN polimerasa que cataliza la síntesis de ácidos nucleicos.

Como se muestra en los ejemplos, en comparación con oligonucleótidos sin modificar estándar que contienen nucleobases naturales, los cebadores que corresponden a dichas moléculas son capaces de mejorar significativamente la afinidad por su ácido nucleico diana, con una especificidad de secuencia inesperadamente elevada.

45 Particularmente, dichas moléculas son entonces herramientas poderosas para métodos de transcripción inversa y de

amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa.

Dichos cebadores permiten de hecho llevar a cabo reacciones de amplificación muy eficientes, específicas y sensibles, tales como PCR.

- 5 Debido a la excepcional afinidad por su diana, los cebadores de la solicitud se pueden usar en concentraciones muy bajas, reducidas hasta 10 veces, cuando se comparan con cebadores estándar (oligonucleótidos sin modificar). Además, se comportan eficientemente a una concentración salina baja, más particularmente a concentración de $MgCl_2$.

La temperatura de hibridación se puede incrementar en varios grados en comparación con los cebadores estándar. Se puede modular según la longitud del oligocatió. n.

- 10 Por lo tanto, es posible librarse de ajustes restrictivos de la temperatura de hibridación y de la concentración salina, más particularmente de la concentración de $MgCl_2$.

Dichos cebadores son útiles en aplicaciones tales como PCR multiplexada o PCR de alto rendimiento.

Dichos cebadores también permiten amplificaciones mejoradas en regiones ricas en AT que se sabe que son difíciles de amplificar mediante PCR.

- 15 Particularmente, las moléculas de la solicitud permiten el diseño de cebadores más cortos, útil para aplicaciones específicas tales como la amplificación en regiones conservadas de genomas con gran variabilidad.

Como se muestra en los ejemplos, dichos cebadores también son útiles en aplicaciones tales como transcripción inversa como oligo(dT), hexámeros o cebadores específicos. Debido a su excepcional afinidad, pueden ser particularmente valiosos para detectar genes poco expresados.

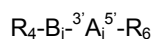
- 20 Dichos cebadores también se pueden usar para la secuenciación del ADN.

En algunos casos, puede ser útil el uso de una molécula de la solicitud con un ligador escindible entre el oligonucleótido y el resto oligocatiónico. En tales métodos en los que se requiere la separación electroforética de los productos de la amplificación, puede ser valiosa la escisión del policatió n tras la amplificación antes de la separación.

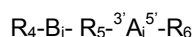
- 25 En una segunda realización, el grupo -OH en la posición 3' de A_i está bloqueado, y de este modo A_i no se puede extender en presencia de una polimerasa.

Las moléculas de dicho segundo grupo tienen

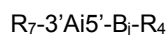
estructura IV



- 30 o estructura V



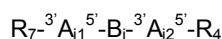
o estructura VI



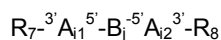
o estructura VII

- 35 $R_7-3'A_i5'-R_5-B_j-R_4$

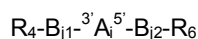
o estructura VIII



o estructura IX



- 40 o estructura X



en las que

- A_{i1} y A_{i2} , idénticos o diferentes, son como se define anteriormente para A_i ;

- B_{j1} y B_{j2} , idénticos o diferentes, son como se define anteriormente para B_j ;
- R_4 y R_6 son idénticos o diferentes, siendo R_4 como se define anteriormente, y R_6 tal como se define anteriormente para R_4 , y
- R_7 y R_8 , idénticos o diferentes, son diferentes de H y se seleccionan del grupo que comprende un ligador, un desactivador, un marcador tal como un grupo cromóforo o fluoróforo, o un resto químico tal como biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, grupo fosfato, o azúcar.

Según la invención, la estructura de dicho conjugado es la estructura IV, en la que R_4 y R_6 , idénticos o diferentes son H o un ligador, un desactivador, un marcador, un grupo cromóforo o fluoróforo, biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, azúcar, o grupo fosfato.

10 Las moléculas de dicha segunda realización se usan para detectar un ácido nucleico diana en un ensayo que comprende una ADN o ARN polimerasa. Son más particularmente útiles como sondas para detectar un ácido nucleico complementario generado mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico *in vitro*, tal como PCR.

15 Las moléculas de dicha segunda realización son más particularmente útiles como sondas para monitorizar la amplificación de ácido nucleico en tiempo real.

La solicitud se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, en el que una molécula de estructura IV a X se puede usar como sonda para hibridarse a un ácido nucleico diana.

La invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, en el que una molécula de estructura IV se puede usar como sonda para hibridarse a un ácido nucleico diana.

20 La solicitud o invención se refiere así a un método tal como se define anteriormente para detectar un ácido nucleico diana, que comprende las etapas de

- incubar dicho ácido nucleico diana con una sonda tal como se define anteriormente en presencia de una ARN o ADN polimerasa en condiciones que permitan que dicha sonda se hibride a dicha molécula de ácido nucleico diana; y

25 - detectar dicha hibridación.

La invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, mediante hibridación con un conjugado de oligonucleótido-oligocatión, que comprende permitir que dicho ácido nucleico reaccione con un conjugado de oligonucleótido-oligocatión que comprende al menos restos A_i y B_j ligados juntos directamente o vía un grupo ligador,

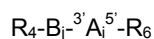
30 en el que

- A_i es un oligonucleótido i -mero, con $i = 3$ a 50, en el que A_i es un oligómero con nucleobases de origen natural o no natural y/o grupos pentafuranosilo y/o enlaces de fosfodiéster nativos, que comprende opcionalmente un grupo marcador
- B_j es un resto oligocatiónico orgánico j -mero, con $j = 1$ a 50, en el que B es

35 $HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$, en el que R_1 , R_2 y R_3 , idénticos o diferentes, son un radical alquileo de C1-C6, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, siendo los restos $NH-R_2$ idénticos o diferentes cuando n es >1 ;

$HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$, en el que R_1 y R_3 , idénticos o diferentes, son un radical alquileo de C1-C6, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, y X es putrescina, espermidina o un resto de espermina,

40 en el que la estructura de dicho conjugado es la estructura IV



en la que

- R_4 y R_6 , idénticos o diferentes, son H o un ligador, un desactivador, un marcador, un grupo cromóforo o fluoróforo, biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, azúcar, o grupo fosfato;

en el que dicho ácido nucleico diana es una secuencia específica en un genoma completo; y

en el que dicho método comprende

- usar dicho conjugado como una sonda de hibridación o sonda marcada dualmente en un ensayo de PCR en tiempo real que comprende una ADN o ARN polimerasa en presencia de dicho genoma completo.

5 Ventajosamente, dichas moléculas son sondas de hibridación y sondas marcadas dualmente valiosas para PCR en tiempo real. Como se muestra en los ejemplos, las sondas de la solicitud o invención disminuyen el fondo de fluorescencia, mejorando de ese modo el comportamiento de la detección del amplicón.

Particularmente, comparadas con las sondas estándar (sondas marcadas dualmente que contienen nucleobases naturales), las sondas marcadas dualmente de la solicitud o invención muestran una mayor desactivación de la emisión de fluorescencia en ausencia de amplificación. Además, como se muestra en los ejemplos, las sondas conjugadas detectan la diana con una mayor sensibilidad.

10 La solicitud o invención se refiere así a un método tal como se define anteriormente para distinguir entre un ácido nucleico diana de tipo salvaje y un ácido nucleico diana mutante.

Ventajosamente, dichas moléculas permiten el diseño de sondas más cortas, útiles en procedimientos de amplificación tales como PCR, facilitando el diseño del conjunto de cebadores/sondas.

15 Las sondas cortas tienen una mayor capacidad de discriminación. Particularmente, dichas moléculas son entonces herramientas poderosas para la discriminación alélica.

Como se muestra en los ejemplos, en comparación con los oligonucleótidos estándar, las sondas que corresponden a moléculas de la solicitud o invención son particularmente útiles para detectar y analizar mutaciones tales como SNP (polimorfismo de un solo nucleótido).

20 En otro aspecto de la solicitud, las moléculas de dicha segunda realización se usan ventajosamente como abrazaderas proporcionando un método para inhibir la amplificación y/o la detección de un ácido nucleico diana.

En una tercera realización, las moléculas de la solicitud se usan más generalmente en un ensayo a base de hibridación, en el que el ácido nucleico diana no es un molde para una polimerasa.

25 La solicitud se refiere a un método para la manipulación de ácido nucleico, en el que una molécula de estructura I a X tal como se define anteriormente se usa como un sustrato para una o más enzimas tras la unión a un ácido nucleico diana.

La solicitud se refiere a un método para la manipulación de ácido nucleico, en el que una molécula de estructura I a X tal como se define anteriormente se une a un ácido nucleico diana en presencia de una o más enzimas en condiciones que permiten que dichas enzimas modifiquen dicho ácido nucleico diana.

30 La solicitud se refiere a un método para manipular, detectar, capturar un ácido nucleico diana, que comprende una molécula de estructura I a X tal como se define anteriormente para que se hibride a un ácido nucleico diana.

La solicitud se refiere así a un método tal como se define anteriormente para detectar un ácido nucleico diana, que comprende las etapas de

- incubar dicho ácido nucleico diana con una sonda de la solicitud tal como se define anteriormente en condiciones que permiten que dicha sonda se hibride a dicha molécula de ácido nucleico diana; y
- 35 - detectar dicha hibridación.

Las moléculas de dicha tercera realización son más particularmente útiles como sondas para detectar ácidos nucleico diana inmovilizados, tales como sobre un soporte sólido o sobre tejidos fijos. Dichas sondas son útiles para métodos de hibridación in situ.

40 Como se muestra en los ejemplos, las sondas cortas de la solicitud pueden detectar un ácido nucleico diana inmovilizado sobre un soporte con una especificidad elevada en condiciones restrictivas que no son permisibles para la sonda estándar.

Las moléculas con A_i que contienen nucleótidos modificados tales como nucleótidos de fosforotioato son particularmente ventajosas a la vista de sus aplicaciones biológicas, puesto que los oligonucleótidos de fosforotioato no se hidrolizan en lisados celulares o fluidos biológicos.

45 Los conjugados mixtos de oligonucleótido-oligocación definidos anteriormente se sintetizan ventajosamente por etapas en un sintetizador de oligonucleótidos, vía la ruta de fosforamidito según el método de dichos documentos WO 2007/069092 o WO 2006/052854 referidos a la síntesis de conjugados poliamínicos de ARN interferente pequeño y a conjugados formados de ese modo.

50 Los oligocaciones activados y protegidos B se obtienen ventajosamente protegiendo los grupos amino de una poliamina, seguido de la α,ω -bishidroxilalquilación, que conduce a dioles compatibles con la síntesis de

oligonucleótidos.

La química clásica de alargamiento mediante DMT y fosforamido se implementa ventajosamente junto con grupos protectores de TFA lábiles a bases.

5 Otras características y ventajas de la solicitud o invención se dan en los siguientes ejemplos, en los que se hace referencia a las Figuras 1 a 9, que representan, respectivamente:

- Figura 1, la estructura de un conjugado de oligonucleótido-oligocación;
- Figura 2, resultados obtenidos con cebadores de la solicitud en PCR de gradiente convencional;
- Figura 3, resultados obtenidos con cebadores de la solicitud a temperatura de hibridación elevada y baja concentración de sal ($MgCl_2$) en experimentos de PCR en tiempo real;
- 10 - Figura 4, resultados obtenidos con dichos cebadores a baja concentración en experimentos de PCR en tiempo real;
- Figura 5, resultados obtenidos con dichos cebadores en un contexto rico en AT en experimentos de PCR en tiempo real;
- Figura 6, resultados obtenidos en RT-qPCR sobre ADNc cebado con un cebador de la solicitud;
- 15 - Figura 7, características de la fluorescencia y resultados obtenidos con sondas fluorógenas marcadas de forma dual de la invención en un ensayo de nucleasa de 5';
- Figura 8, resultados obtenidos con sondas de hibridación fluorescentes de la solicitud en PCR en tiempo real;
- Figura 9, resultados obtenidos con una sonda fluorescente de la solicitud usada para detectar un ácido nucleico diana inmovilizado sobre un soporte sólido.

20 En los siguientes ejemplos, "S" designa un resto de espermina de estructura:

- $HPO_3-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)^3-NH_2^+-(CH_2)_4-O-$, y Sn indica el número de restos de espermina, con n = 1 a 50.
- "Nm" designa un oligonucleótido m-mero.

Ejemplo 1: Estructura de un conjugado de oligonucleótido-oligocación de la solicitud

25 La síntesis se lleva a cabo según el documento WO 2007/069092, y la estructura del conjugado de oligonucleótido-oligocación se ilustra en la Figura 1.

Ejemplo 2: Uso de conjugados de oligonucleótido-oligocación como cebadores de PCR

30 Dos parejas de cebadores de oligonucleótido-oligocación específicos para los genes E7 y L1 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16) se compararon con sus equivalentes estándar (oligonucleótidos no conjugados). Las moléculas de la solicitud también se compararon con cebadores modificados con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

Las secuencias de los cebadores de E7 proceden de Hesselink et al., 2005. Las secuencias de los cebadores de L1 se adaptan de de Roda Husman et al., 1995.

35 El par de cebadores de E7 (46% y 48% de GC) y el par de cebadores de L1 (30% y 20% de GC) ilustran dos contenidos de GC diferentes.

Como ADN genómico diana, se usó ADN genómico de células SiHa (carcinoma cervical, ATCC HTB35) que contiene 1 a 2 copias de HPV16 integrado. El ADN genómico de células A549 (carcinoma de pulmón, ATCC CCL185), que no contiene el virus, se usó como control negativo.

Los cebadores de la solicitud son ejemplos de estructura I.

- 40 • Secuencias de los oligonucleótidos estándar (cebadores de E7)
 - Cebador directo de SEC ID N°1 (E7F): 5'- GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT- 3'
 - Cebador inverso de SEC ID N°2 (E7R): 5'- GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA- 3'
- Secuencias de los conjugados de oligonucleótido-oligocación según la solicitud (cebadores de S4-E7)
 - Cebador directo de SEC ID N°3 (S4-E7F): 5'- S₄ – GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT- 3'

ES 2 537 625 T3

Cebador inverso de SEC ID N°4 (S4-E7R): 5'- S₄ - GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA- 3'

- Secuencias de los oligonucleótidos que contienen LNA (cebadores de LNA-E7)

Cebador directo de SEC ID N°5 (LNA- E7F): 5'- GaG Gag GAG GAT GAA ATA GAT GGT- 3'

Cebador inverso de SEC ID N°6 (LNA-E7R): 5'- GCc CAT tAA CAG GTC TTC CAA- 3'

5 Los nucleótidos de LNA están subrayados y en minúsculas

S₄ = 4 restos de espermina

- Secuencias de los oligonucleótidos estándar (cebadores de L1)

Cebador directo de SEC ID N°7 (L1F): 5'- TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC- 3

Cebador inverso de SEC ID N°8 (L1R): 5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3'

10 • Secuencias de los cebadores según la solicitud (cebadores de S_n-L1)

Cebador directo de SEC ID N°9 (S_n-L1F): 5'- S_n – TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC- 3'

Cebador inverso de SEC ID N°10 (S_n-L1R): 5'-S_n-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT AAT C- 3'

S_n = n restos de espermina; n 0 4 y 5

- Secuencias de los oligonucleótidos que contienen LNA (cebadores de LNA-L1)

15 Cebador directo de SEC ID N°11 (L1F): 5'- TTt_GTT aCT GTT GTT GAT ACT AC- 3'

Cebador inverso de SEC ID N°12 (L1R): 5'- GAa AAA tAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3'

Los nucleótidos de LNA están subrayados y en minúsculas.

20 La Figura 2 representa el uso de cebadores de la solicitud en PCR convencional. Los comportamientos de la amplificación se evaluaron en el punto final de la PCR en función de las temperaturas de hibridación usando un procedimiento de PCR de gradiente.

El ADN genómico diana y el de control se amplificaron en un volumen de reacción de 25 µl. Cada muestra se amplificó en presencia de 0,4 de ADN, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1% de Triton X-100, 200 µM de dNTP (cada uno), 0,04 U/µl de EconoTaq DNA Polymerase (Lucigen), y los siguientes pares de cebadores:

- 25 - 100 nM de cebadores estándar de E7 (Figura 2a: panel superior) o cebadores de S4-E7 (Figura 2a: panel inferior), o
- 500 nM de cebadores estándar de L1 (Figura 2b: panel superior); cebadores de LNA-L1 (Figura 2b: panel central); y cebadores de S5-L1 con 5 restos de espermina (Figura 2b: panel inferior),
- 30 - 500 nM de cebadores estándar de L1 (Figura 2c: parte superior); cebadores de S4-L1 con 4 restos de espermina (Figura 2c: parte central); y cebadores de S5-L1 con 5 restos de espermina (Figura 2c: parte inferior).

35 Las amplificaciones en gradiente se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (Biorad) según lo siguiente: desnaturalización inicial: 3 min. a 95°C, ciclos: 35 (a, c) y 30 (b) ciclos: 94°C durante 20 s, 60°C-69°C (a) durante 20 s o 52°C-61°C (b, c) durante 20 s, 72°C durante 15 s; alargamiento final: 5 min. a 72°C. Las reacciones de PCR finales se analizaron sobre gel de agarosa al 4%. El tamaño del producto de E7 y de L1 es 159 pb y 142 pb, respectivamente.

40 Como se muestra en la Figura 2a, los conjugados seleccionados según la solicitud que tienen 4 restos de espermina en el extremo 5' amplifican específicamente su diana. Al igual que los cebadores estándar, amplifican de hecho un fragmento de secuencia vírica que tiene el tamaño esperado de 159 pb a partir del ADN genómico de las células SiHa diana. Por el contrario, no se obtiene ninguna amplificación a partir de ADN genómico de células A549 en las mismas condiciones de amplificación.

Ventajosamente, usando los conjugados oligonucleotídicos de la solicitud, la reacción de hibridación se puede llevar a cabo a mayor temperatura (4 a 7°C, dependiendo del par de cebadores (Figuras 2a y 2b).

45 Ventajosamente, usando los conjugados oligonucleotídicos de la solicitud, la reacción de hibridación se puede llevar a cabo a una mayor temperatura que los cebadores que contienen LNA (4-5°C, véase la Figura 2b).

Los resultados dados en la Figura 2c muestran que la ganancia en temperatura se puede modular con el número de esperminas conjugadas al oligonucleótido.

5 Las moléculas de la solicitud se evaluaron para determinar su uso como cebadores en experimentos de PCR en tiempo real. Los conjugados de los cebadores se han comparado con sus equivalentes estándar sin modificar, así como con cebadores que contienen LNA.

Todas las reacciones se han llevado a cabo en un instrumento Rotor-gene 6000 (Corbett) en un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo usando el kit de ADN Sensimix NoRef (Quantace) a una concentración final de 0,5X.

10 La eficiencia y sensibilidad se evaluaron amplificando diluciones en serie de ADN genómico de células diana positivas para HPV16 (células SiHa) aplicadas en 10 ng de ADN genómico de control, es decir, 3000 genomas de células negativas para HPV (células A549).

Las muestras se amplificaron en diversas condiciones de temperatura de hibridación, concentración de $MgCl_2$ o concentración de cebadores, usando SYBR Green I para la detección.

15 Figura 3: Efectos de la concentración de $MgCl_2$ y de la temperatura de hibridación sobre la amplificación en tiempo real.

Las reacciones se llevaron a cabo en 10 ng de ADN genómico diana y con 100 nM de cada cebador. La concentración final de $MgCl_2$ fue 1,5 mM o 3 mM, según se indicó. Un comienzo caliente de 10 min. a 95°C fue seguido de 45 ciclos de 94°C durante 20 s, 63°C (a) o 66°C (b) durante 20 s y 72°C durante 15 s.

20 Como se muestra en la Figura 3a, las moléculas de la solicitud (S4-E7) son óptimas cuando se hibridan a 63°C en 1,5 mM de $MgCl_2$. De forma comparativa, los cebadores estándar y los cebadores que contienen LNA son ineficaces, como se muestra mediante el incremento en el umbral de ciclo (16 para conjugados de la solicitud), 33 para cebadores estándar y 24 para cebadores que contienen LNA). El incremento de la concentración de $MgCl_2$ mejora los comportamientos de los cebadores estándar y cebadores que contienen LNA. También resulta de dicha Figura 3 que es necesaria una menor temperatura de hibridación con cebadores estándar y con cebadores que contienen LNA, mientras que dichos conjugados de S4-E7 se comportan eficientemente a 63°C.

Como se muestra en las Figuras 3b y 3c, a concentraciones fijas de cebadores (100 nM) y concentraciones bajas de $MgCl_2$ (1,5 mM), se pueden detectar hasta 3 copias de la diana con dichos conjugados de S4-E7, con una reproducibilidad, especificidad y eficiencia elevadas a una temperatura de hibridación de 66°C.

30 Las amplificaciones específicas, eficientes y sensibles se obtienen con los conjugados de cebadores de la solicitud, a una temperatura o condiciones de $MgCl_2$ generalmente subóptimas para los cebadores estándar y cebadores que contienen LNA.

El efecto de la concentración de cebador se ilustra mediante la Figura 4.

Figura 4a: Se amplificaron diluciones en serie de 10 veces de ADN genómico diana con 10 nM de conjugados de cebadores de la solicitud en 1,5 mM de $MgCl_2$.

35 Figura 4b: Se amplificaron 2 ng de ADN genómico diana aplicado en 10 ng de ADN genómico de control, usando cantidades variables de cebadores: 10, 20 y 30 nM de conjugados de cebadores de la solicitud (panel superior); 10, 25 y 50 nM para cebadores estándar (panel central) y cebadores que contienen LNA (panel inferior). La concentración de $MgCl_2$ fue 1,5 mM para conjugados de la solicitud, y 3 mM para cebadores estándar y cebadores que contienen LNA.

40 Las amplificaciones se llevaron a cabo según lo siguiente: 95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 1 min.

45 La Figura 4a muestra que 10 nM de moléculas cebadoras de la solicitud realizan amplificaciones eficientes y sensibles en reacciones de PCR de dos etapas. De hecho, se detectan cuantitativamente 3 copias de la diana. Como se muestra en la Figura 4b, la reducción en la concentración de cebadores no induce un incremento en el valor de Ct. Solamente se disminuye la cantidad final de amplicón en el punto final de la reacción. De forma comparativa, 50 nM de oligonucleótidos estándar o de cebadores que contienen LNA, en 3 mM de $MgCl_2$, no es suficiente para amplificar la diana de forma óptima como lo hacen los cebadores conjugados.

50 Ventajosamente, los conjugados de los cebadores de la solicitud muestran una mayor afinidad por su diana, permitiendo su uso a una concentración baja de $MgCl_2$ en comparación con oligonucleótidos estándar y cebadores que contienen LNA. Dichas moléculas permiten una reducción de la concentración de cebadores hasta 10 veces en comparación con oligonucleótidos estándar y cebadores que contienen LNA, sin pérdida de sensibilidad, eficiencia, especificidad o reproducibilidad.

Como se muestra en la Figura 5, las moléculas cebadoras de la solicitud mejoran la PCR en secuencias ricas en AT.

Ventajosamente, dichas moléculas permiten llevar a cabo la reacción eficiente en condiciones estándar (1,5 mM de MgCl₂, hibridación a 60°C).

En la Figura 5a, se amplificaron diluciones en serie de 5 veces de ADN genómico diana con 100 nM de conjugados de la solicitud. La concentración final de MgCl₂ fue 1,5 mM. Las reacciones se incubaron a 95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 94°C durante 20 s, 60°C durante 20 s y 72°C durante 15 s. En estas condiciones, los conjugados de la solicitud realizan amplificaciones eficientes (véase la curva patrón (E= 0,89; R² = 0,992)) y sensibles, como se muestra mediante la detección de 1 copia de la diana.

De forma comparativa (Figura 5b), 600 copias de dianas son amplificadas ineficientemente por los cebadores estándar y cebadores que contienen LNA. Las condiciones fueron las siguientes: se amplificaron 2 ng de ADN genómico diana (que representan 600 copias de diana) aplicados en 10 ng de ADN genómico de control usando un protocolo de amplificación de dos etapas (95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 1 min.) con 150 nM de conjugados de la solicitud (con 4 ó 5 esperminas) (panel superior); 150 nM, 500 nM y 1 nM para cebadores estándar (panel central) y cebadores que contienen LNA (panel inferior). La concentración de MgCl₂ fue 1,5 mM para conjugados de esta solicitud, y 3 mM para cebadores estándar y cebadores que contienen LNA.

Ejemplo 3: Uso de conjugados de oligonucleótido-oligocación como cebador para la transcripción inversa

Las moléculas de la solicitud se evaluaron para determinar su uso como cebador para transcripción inversa. Se sintetizó ADNc procedente de ARN total usando una polidesoxirribotimidina que contiene 20 restos conjugada con 4 restos de espermina (S4-oligo(dT)₂₀) o su equivalente no conjugado (oligo(dT)₂₀). Se llevaron a cabo reacciones de RT-qPCR subsiguientes para la amplificación del transcrito de ciclina B1, para comparar la eficiencia de la transcripción inversa.

- Secuencias de los cebadores

oligo(dT)₂₀ de SEC ID N°13: 5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

S4-oligo(dT)₂₀ de SEC ID N°14: 5'-S₄- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

S₄ = 4 restos de espermina

Cebador directo de Ciclina B1 de SEC ID N°15: 5'- TCTGGATAATGGTGAATGGACA -3'

Cebador inverso de Ciclina B1 de SEC ID N°16: 5'- CGATGTGGCATACTTGTCTTCTG -3'

Se extrajo ARN total de células HCT 116 (de ATCC CCL-247) usando el kit de aislamiento de ARN total SV (Promega). Un µg de ARN total se transcribió de forma inversa usando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra SuperScript III para RT-PCR (Invitrogen), como se describe por el proveedor. Las reacciones (RT+) se cebaron usando 50 µM de la molécula de la solicitud (S4-oligo(dT)₂₀) o su equivalente no conjugado (oligo(dT)₂₀). Como control, se llevaron a cabo reacciones sin transcriptasa inversa (RT-).

La Figura 6 muestra amplificaciones mediante RT-qPCR del transcrito de Ciclina B1 llevadas a cabo usando reacciones de síntesis de ADNc (RT+ y RT-) que corresponden a 5 ng de ARN total. Las reacciones se han realizado en un instrumento Rotor-gene 6000 (Corbett) en un volumen final de 10 µl. Las mezclas de reacción finales contenían 2,5 µl de kit de PCR Sensimix NoRef (Quantace), SYBR Green 0,5x, 100 nM de cada cebador específico de Ciclina B1, y 3 mM de MgCl₂.

Las reacciones se incubaron a 95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 1 min.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel sobre 4% de gel de agarosa (Figura 6b).

La Figura 6a muestra curvas idénticas de amplificación de ciclina B1 a partir de muestras de ADNc cebadas con la molécula de la solicitud o su equivalente estándar. Se han sintetizado productos de PCR idénticos en el tamaño esperado (157 pb) (Figura 6b). En todas las muestras aparecieron productos tardíos fuera de diana en ausencia de la transcriptasa inversa.

La molécula de oligo(dT)-OH conjugada de la solicitud permite la síntesis eficiente de ADNc cuando se usa como cebador para la transcripción inversa.

Ejemplo 4: Uso de conjugados de oligonucleótido-oligocación como sonda de PCR marcada dualmente en PCR en tiempo real.

Las sondas marcadas dualmente son las sondas más ampliamente usadas para monitorizar la amplificación en PCR en tiempo real. También denominadas sondas TaqMan™, consisten en una secuencia oligonucleotídica que se hibrida internamente al amplicón con un fluoróforo unido en el extremo 5' y un desactivador en el extremo 3' (Livak et

al., 1995). Si ambos marcadores están suficientemente próximos en disolución, la energía emitida por el fluoróforo excitado es absorbida por el desactivador a través del proceso de FRET (transferencia de energía de fluorescencia), conduciendo a una señal de fluorescencia baja. Durante la reacción de PCR basada en el método de nucleasa de 5' (Holland et al., 1991), la sonda se une al amplicón en cada etapa de hibridación. Cuando uno de los cebadores se alarga mediante la Taq ADN polimerasa, la sonda se desplaza desde la hebra del molde y es hidrolizada por la actividad de polimerasa 5'-3' exonucleasa. La escisión conduce a la liberación del informador fluorescente y provoca el incremento en la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de producto de PCR generado.

Los conjugados de oligonucleótido-oligocación de la invención se evaluaron para determinar su uso como sondas de detección de PCR en tiempo real en un ensayo de nucleasa de 5' diseñado para amplificar el gen del Factor V humano. Como modelo para evaluar la capacidad de dichas sondas para el genotipado de SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), se usó la mutación G1691A de Leiden en el gen del Factor V humano.

Las secuencias de las sondas y de los cebadores se adaptaron de Luderer et al., 2004.

Dos oligonucleótidos que contienen 17 y 22 restos nucleotídicos se conjugaron con 4 restos de espermina en su extremo 3'. Dichos conjugados se marcaron en 5' con una 6 carboxifluoresceína (6-FAM, Sigma) y con un Black Hole Quencher™ (BHQ-1™, Glen Research) ligados al oligocación. Esta sonda fluorógena marcada dualmente de la invención se comparó con sus equivalentes no conjugados a oligocación.

Todas las sondas se diseñaron para detectar el alelo de tipo salvaje. Se extrajo ADN de tipo salvaje y de Leiden del Factor V a partir de las estirpes celulares A549 (ATCC CCL-185) y GM14899 (Coriell Institute), respectivamente.

Las sondas marcadas dualmente de la invención son ejemplos de estructura IV.

- Secuencias de los cebadores

Cebador directo de SEC ID N°15: 5'-GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT-3'

Cebador inverso de SEC ID N°16: 5'-TT CTG AAA GGT TAC TTC AAG GAC AA-3'

- Secuencias de las sondas

- Secuencia de la sonda según la invención:

SEC ID N°15 (F-N17S4): 5' 6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CT -S4 BHQ-1

S4 = 4 restos de espermina

- Secuencia de las sondas estándar

SEC ID N°17 (F-N17): 5' 6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CT -BHQ-1

SEC ID N°18 (F-N22): 5'6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CTG TCC A- BHQ-1

El sitio de SNP está subrayado.

Se realizaron reacciones de PCR en un instrumento Rotor-gene 6000 (Corbett) en un volumen final de 10 µl. Como molde, se usaron 10 ng de ADN genómico de tipo salvaje (b), diluciones en serie de 10 veces de ADN genómico de tipo salvaje aplicado en 10 ng de ADN de control (c), y 10 ng de ADN genómico de tipo salvaje o mutante (d). Las mezclas de reacción finales contenían 2,5 µl del kit de PCR Sensimix NoRef (Quantace), 200 nM de cada cebador y 200 nM de sonda. La concentración final de MgCl₂ fue 3 mM. Como control negativo (ADN no diana), se usó ADN de esperma de salmón.

La fluorescencia de fondo pura medida al comienzo de la reacción de PCR por el instrumento es una indicación de la eficiencia autodesactivante de la sonda marcada dualmente. Como se muestra en la Figura 7a, la sonda conjugada de la invención (F-N22S4) muestra una mejor desactivación de la fluorescencia que su equivalente estándar (F-N22) (valores de la fluorescencia de fondo: 4,8 frente a 24 unidades). La desactivación depende de la proximidad física de los dos colorantes. Al pegar el polinucleótido debido a interacciones electrostáticas, el policación se aproxima al par fluoróforo/desactivador unido terminalmente. Las moléculas de la invención son sondas valiosas marcadas dualmente con características desactivantes mejoradas.

La Figura 7b muestra los comportamientos comparados de la sonda según la invención y su equivalente estándar en ensayo de nucleasa de 5'. La sonda conjugada muestra una mayor relación señal a ruido, conduciendo a una detección más temprana (2,5 ciclos) y a una mayor fluorescencia de punto final.

De este modo, las sondas según la invención muestran una mayor sensibilidad para detectar sus dianas.

Se comparó entonces una sonda conjugada corta (17-mero, F-N₁₇) con una sonda estándar larga (22-mero, F-N₂₂).

Como se muestra en la Figura 7c, la sonda corta de la invención (F-N₁₇S₄) detecta el amplicón de tipo salvaje con la misma eficiencia y sensibilidad con que lo hace la sonda estándar larga (F-N₂₂). De hecho, los umbrales del ciclo y los valores de la fluorescencia final son comparables. En las mismas condiciones, la sonda estándar corta (F-N₁₇) se comporta mal (Figura 7d).

- 5 La Figura 7d aborda la cuestión de la discriminación alélica. En muestras que contienen como molde el ADN de Leiden del Factor V, el amplicón mutado todavía se detecta con la sonda estándar de tipo salvaje larga, mientras que no se observa señal con sondas cortas conjugadas y estándar.

De este modo, las sondas cortas según la invención muestran un comportamiento igual que las sondas estándar convencionales más largas. Además, tienen una mayor capacidad de discriminación.

10 **Ejemplo 5: Uso de conjugados de oligonucleótido-oligocación como sonda de hibridación fluorescente en PCR en tiempo real**

Las moléculas de la solicitud se evaluaron para determinar su uso como sondas fluorescentes adyacentes en PCR en tiempo real (Bernard et al., 1998). Ese modo de detección se basa en la hibridación de dos sondas adyacentes entre sí en el amplicón. Una sonda tiene un marcador dador en 3', mientras que la otra tiene un marcador aceptor en 5'. Cuando ambas sondas están unidas al amplicón específico, el marcador dador de 3' excitado transfiere su energía al marcador aceptor mediante el mecanismo de FRET, que a su vez emite fluorescencia. El incremento en la fluorescencia emitida por el dador es proporcional al incremento en el producto de la PCR.

Se diseñaron dos sondas adyacentes para unirse al amplicón E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16) durante la etapa de hibridación de qPCR. La sonda dadora se marcó en el extremo 3' con una 6-FAM, y la sonda aceptora se marcó en el extremo 5' con el colorante ROX (carboxi-x-rodamina).

La sonda dadora estándar se comparó con moléculas de la solicitud.

La sonda dadora es un ejemplo de estructura VII.

Se amplificaron 300 copias (a) o diluciones en serie (3000 a 30 copias) (b) de ADN genómico diana (procedente de células SiHa) aplicadas en 10 ng de ADN genómico de control (procedente de células A549) en un instrumento Rotor-gene 6000 (Corbett) en un volumen final de 10 µl. Las mezclas de reacción finales contenían 2,5 µl del kit de PCR Sensimix NoRef (Quantace), 3 mM de MgCl₂, 200 nM de cebador directo, 300 nM de cebador inverso, 200 nM de sonda E7-ROX (Eurogentec). Las sondas E7-N₂₅F, E7-S₄N₂₅F y E7-S₄N₂₀F fueron 200 nM (a) y 50 nM (b).

Las reacciones se incubaron a 95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 95°C durante 5 s, 55°C durante 10 s, 72°C durante 10 s.

- 30 Como se muestra en la Figura 8a, la sonda conjugada permite la detección eficiente del amplicón.

Debido al solapamiento espectral de ambos marcadores, se observa una señal de fondo elevada en ausencia de amplicón. Debido a su elevada afinidad, se espera que los conjugados de oligonucleótido-oligocación reduzcan el nivel de fondo de la fluorescencia al realizar la detección eficiente a concentración baja. Además, se espera que los conjugados de oligonucleótido-oligocación permitan el diseño de sondas cortas eficientes, conduciendo a una mejora en la discriminación de los desemparejamientos.

Como se representa en la Figura 8b, una sonda más corta de la solicitud (E7-S₄N₂₀F) muestra de hecho mejores comportamientos a concentración baja que la sonda estándar (E7-N₂₅F).

Las moléculas de la solicitud son sondas de hibridación valiosas para PCR en tiempo real.

- Secuencias de las sondas de E7

40 Cebador directo de SEC ID N°1 (E7F): 5'- GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT- 3'

Cebador inverso de SEC ID N°2 (E7R): 5'- GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA- 3'

- Secuencias de las sondas

SEC ID N°19 (E7-ROX): 5'- ROX-TGCGTACAAAGCACACACGTAGACAT 3'

SEC ID N°20 (E7N₂₅F): 5' - GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

45 SEC ID N°21 (E7N₂₅F): 5' -S₄-GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

SEC ID N°22 (E7S₄N₂₀F): 5' -S₄-TGTGACTCTACGCTTCGGTT -6-FAM 3'

S₄ = 4 restos de espermina

Ejemplo 6: Uso de un conjugado de oligonucleótido-oligocación como sonda fluorescente para detectar ácido nucleico diana inmovilizado en un soporte sólido.

Las moléculas de la solicitud se evaluaron para determinar su uso como sondas de hibridación para detectar y/o genotipar ácidos nucleicos diana inmovilizados.

- 5 La Figura 9 muestra los resultados de un experimento de hibridación de ADN por transferencia de puntos. Los ácidos nucleicos diana fueron vectores informadores de luciferasa pGL2 y pGL3 (Promega). Se diseñó una sonda corta (14-mero) para que coincidiese perfectamente con el vector pGL3. Mediante la hibridación a pGL2, dicha secuencia forma un desemparejamiento. La sonda de la solicitud se comparó con su equivalente estándar. Ambas sondas se marcaron en 5' con una fluoresceína.
- 10 Se inmovilizó un μg de vectores pGL2 y pGL3 sobre una membrana de nailon cargada positivamente (Roche) colocándola a 80°C durante 60 min., y se desnaturalizaron incubando la membrana en NaOH 0,4 M durante 5 min. Las membranas se lavaron entonces brevemente en 2X SSC (tampón de citrato salino sódico) y se secaron al aire. La etapa de prehibridación se llevó a cabo en 5X SSC, 5X disolución de Denhardt durante 60 min. a 55°C. Las membranas se incubaron durante 120 min. a 55°C con 10 nM de sonda en 1X SSC. Después de 3 lavados en 1X SSC a 55°C durante 5 min., las membranas se escanearon en un sistema de formación de imágenes Typhoon (Amersham Bioscience).

Como se muestra en la Figura 9, la sonda de la solicitud permite la detección del ácido nucleico diana en condiciones restrictivas (55°C y poca sal), mientras que la sonda estándar no lo permite. No se detecta señal en la diana desemparejada, mostrando la elevada especificidad de la sonda de la solicitud.

- 20 • Secuencias de las sondas

SEC ID N°23 (N14): 5'-fluoresceína-AAG ATG GAA CCG CT-3'

SEC ID N°25 (S4N14): 5'- fluoresceína -S4-AAG ATG GAA CCG CT-3'

S4 = 4 restos de espermina

El sitio de desemparejamiento está subrayado.

- 25 Referencias

Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* Oct de 1998; 153(4):1055-61.

Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD. Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem Sci.* Feb. de 2004; 29(2):62-71. Revisión

- 30 de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* Abril de 1995; 76 (Pt 4):1057-62.

- 35 Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuismink ZM, Molano M, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 ADN in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol.* Sept. de 2005; 43(9):4868-71.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* ADN polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 de agosto de 1991; 88(16):7276-80.

- 40 Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleótidos with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* Jun. de 1995; 4(6):357-62.

Luderer R, Verheul A, Kortlandt W. Rapid detection of the factor V Leiden mutation by real-time PCR with TaqMan minor groove binder probes. *Clin Chem.* Abril de 2004; 50(4):787-8.

- 45 Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J.* 1 de Marzo de 1986; 234(2):249-62. Revisión.

Pons B, Kotera M, Zuber G, Behr JP. Online synthesis of diblock cationic oligonucleótidos for enhanced hybridization to their complementary sequence. *ChemBiochem.* Agosto de 2006; 7(8):1173-6.

Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:749-90. Revisión.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Polyplus Transfection
<120> Método para hibridar ácidos nucleicos
<130> CP/BB 62715-3159
<150> EP 07 025 148.3
5 <151> 27-12-2007
<150> US 61/009 145
<151> 27-12-2007
<160> 19
<170> PatentIn version 3.3
10 <210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencias artificiales
<220>
15 <223> oligonucleótidos
<400> 1
gaggaggagg atgaaataga tggt 24
<210> 2
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencias artificiales
<220>
<223> oligonucleótidos
<400> 2
25 gccattaac aggtcttcca a 21
<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencias artificiales
30 <220>
<223> oligonucleótidos
<400> 3
gaggaggagg atgaaataga tggt 24
<210> 4
35 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencias artificiales

<220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 4
 gccattaac aggtctcca a 21
 5 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 10 <223> Oligonucleótidos
 <400> 5
 gaggaggagg atgaaataga tgg 24
 <210> 6
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 6
 20 gccattaac aggtctcca a 21
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 25 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 7
 ttgttactg ttgtgatac tac 23
 <210> 8
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> oligonucleótidos
 35 <400> 8
 gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25
 <210> 9

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 5 <223> Oligonucleótidos
 <400> 9
 ttgttactg ttgtgatac tac 23
 <210> 10
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 10
 15 gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 20 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 11
 ttgttactg ttgtgatac tac 23
 <210> 12
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> oligonucleótidos
 30 <400> 12
 gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> Oligonucleótidos

<400> 13
 gcctctgggc taataggact actt 24
 <210> 14
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> oligonucleótidos
 <400> 14
 10 ttctgaaagg ttacttcaag gacaa 25
 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 15 <220>
 <223> oligonucleótidos
 <400> 15
 acctgtattc ctcgcct 17
 <210> 16
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 25 <400> 16
 acctgtattc ctcgcct 17
 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencias artificiales
 <220>
 <223> Oligonucleótidos
 <400> 17
 acctgtattc ctcgcctgtc ca 22
 35 <210> 18
 <211> 14
 <212> ADN

<213> Secuencias artificiales

<220>

<223> Oligonucleótidos

<400> 18

5 aagatggaac cgct 14

<210> 19

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencias artificiales

10 <220>

<223> Oligonucleótidos

<400> 19

aagatggaac cgct 14

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, mediante hibridación con un conjugado de oligonucleótido-oligocación, que comprende permitir que dicho ácido nucleico reaccione con un conjugado de oligonucleótido-oligocación que comprende al menos restos A_i y B_j enlazados juntos directamente o vía un ligador, en el que
- A_i es un oligonucleótido i-mero, con $i = 3$ a 50 , en el que A_i es un oligómero con nucleobases de origen natural o no natural y/o grupos pentafuranosilo y/o enlaces de fosfodiéster nativos, que comprende opcionalmente un grupo marcador,
 - B_j es un resto oligocaciónico orgánico j-mero, con $j = 1$ a 50 , en el que B es
- 10 $HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$, en el que R_1 , R_2 y R_3 , idénticos o diferentes, son un radical alquileo de C1-C6, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, siendo los restos $NH-R_2$ idénticos o diferentes cuando n es >1 ;
- $HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$, en el que R_1 y R_3 , idénticos o diferentes, son un radical alquileo de C1-C6, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, y X es putrescina, espermidina o un resto de espermina,
- 15 en el que la estructura de dicho conjugado es la estructura IV
- $$R_4-B_j-{}^3A_i{}^5-R_6$$
- en la que
- R_4 y R_6 , idénticos o diferentes, son H o un ligador, un desactivador, un marcador, un grupo cromóforo o fluoróforo, biotina, cadena hidrófoba, derivado de colesterol, antígeno, proteína, péptido, azúcar, o grupo fosfato;
- 20 en el que dicho ácido nucleico diana es una secuencia específica en un genoma completo; y en el que dicho método comprende
- usar dicho conjugado como una sonda de hibridación o sonda marcada dualmente en un ensayo de PCR en tiempo real que comprende una ADN o ARN polimerasa en presencia de dicho genoma completo.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho genoma completo es ADN genómico.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que los nucleótidos de A_i se seleccionan del grupo que consiste en desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos bloqueados (LNA), PNA así como sus modificaciones químicas o sustituciones por grupos fosforotioato, 2'-fluoro o 2'-O-alquilo.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho conjugado se usa como una sonda marcada dualmente en dicho ensayo de PCR en tiempo real.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que B es $HPO_3-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-O-$.
6. El método de la reivindicación 5, en el que $j = 4$.
7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en el que R_4 es un desactivador, y R_6 es un fluoróforo.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que los nucleótidos de A_i son desoxirribonucleótidos.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que al menos un conjugado de oligonucleótido-oligocación se usa como una sonda para distinguir entre un ácido nucleico diana de tipo salvaje y un mutante.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que al menos un conjugado de oligonucleótido-oligocación se usa como una sonda para la discriminación alélica.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que al menos un conjugado de oligonucleótido-oligocación se usa como una sonda para detectar mutaciones.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y 11, en el que al menos un conjugado de oligonucleótido-oligocación se usa como una sonda para detectar SNP.
- 45 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que dicho conjugado se usa como una sonda de detección en tiempo real en un ensayo de nucleasa de 5' diseñado para amplificar el gen del Factor V humano.

Figura 1

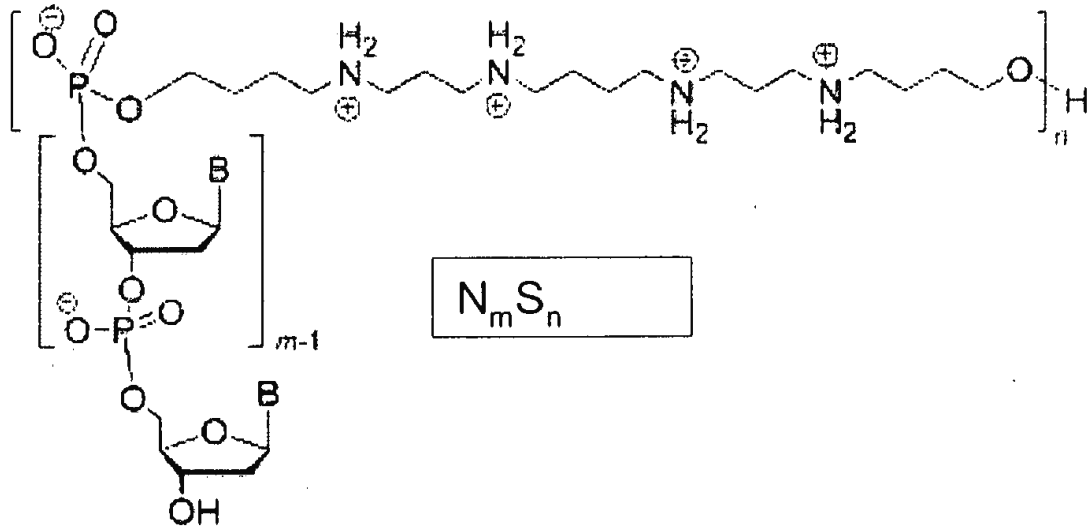
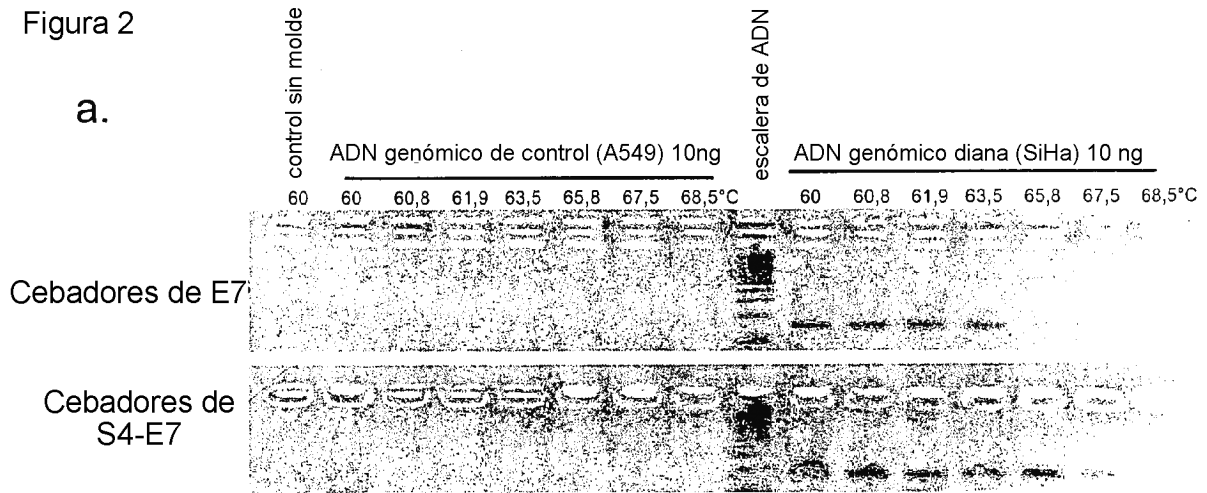
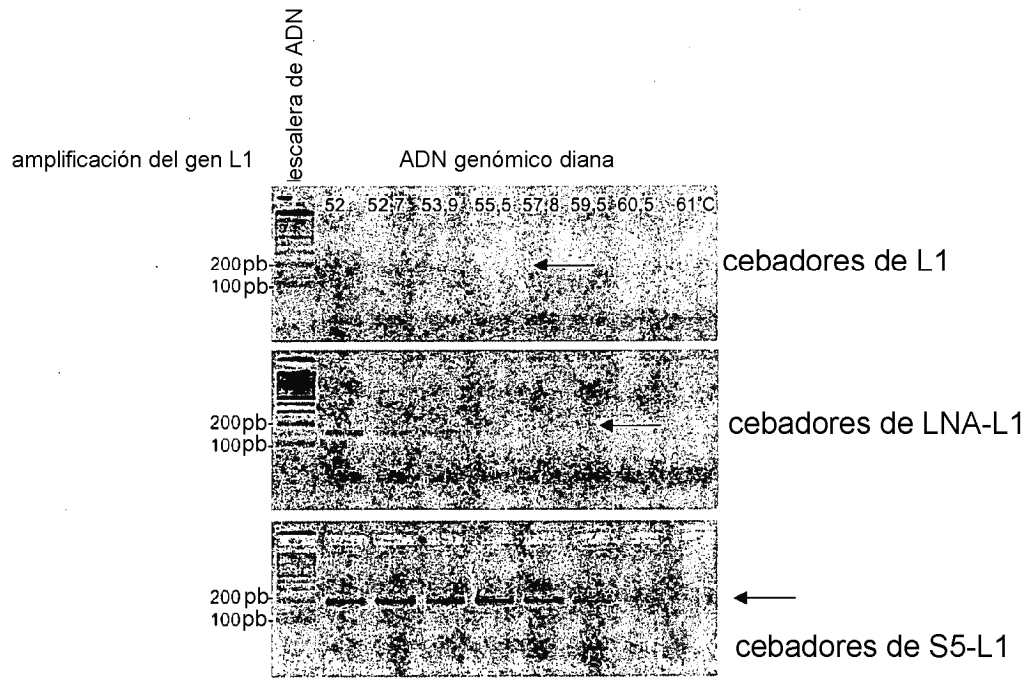


Figura 2



b.



c.

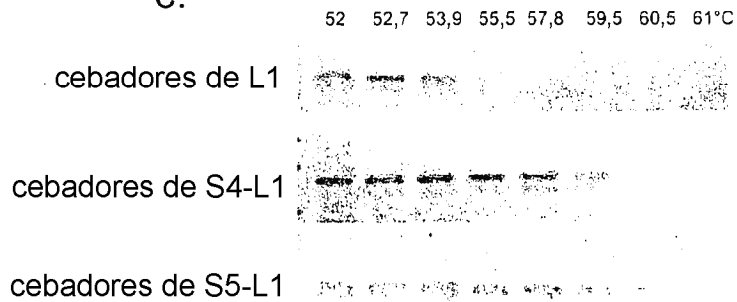


Figura 3

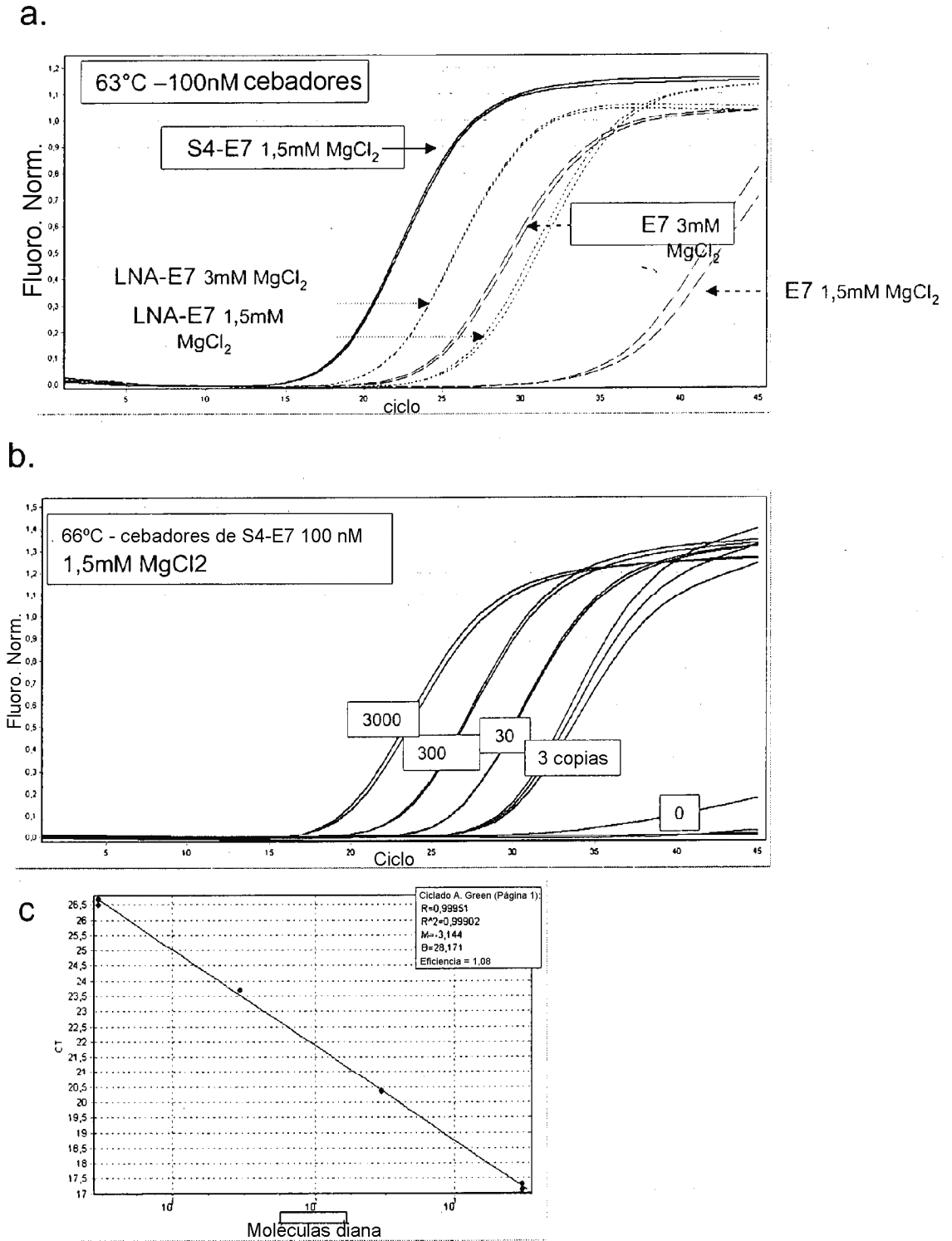
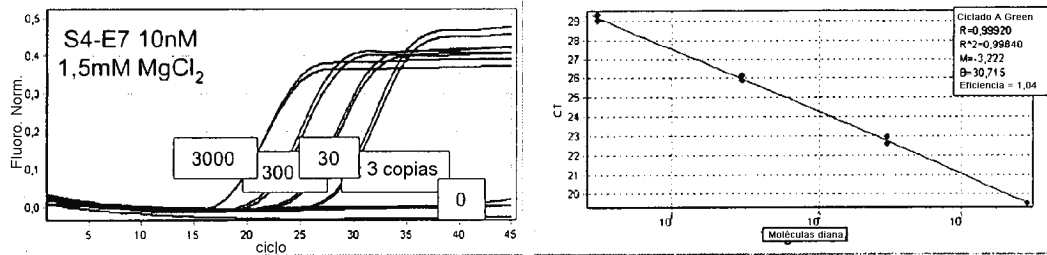


Figura 4

a.



b.

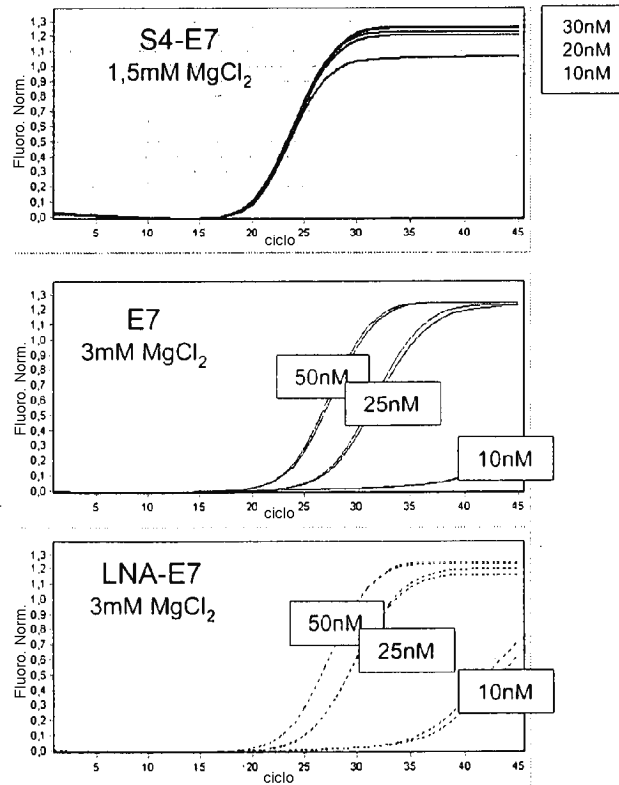
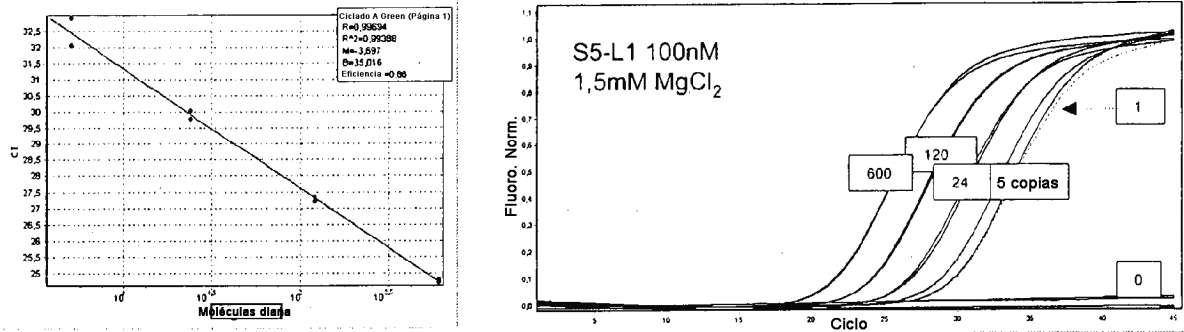


Figura 5

a.



b.

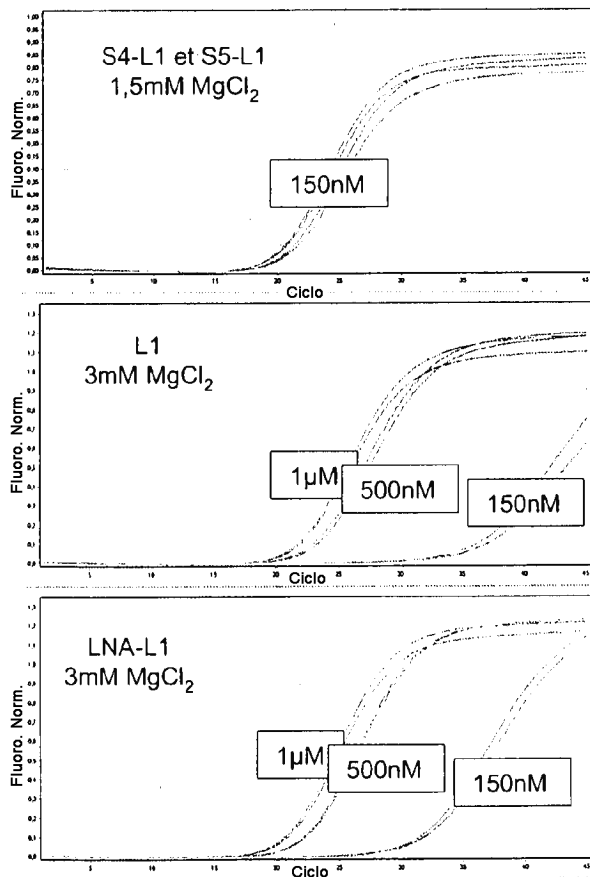


Figura 6

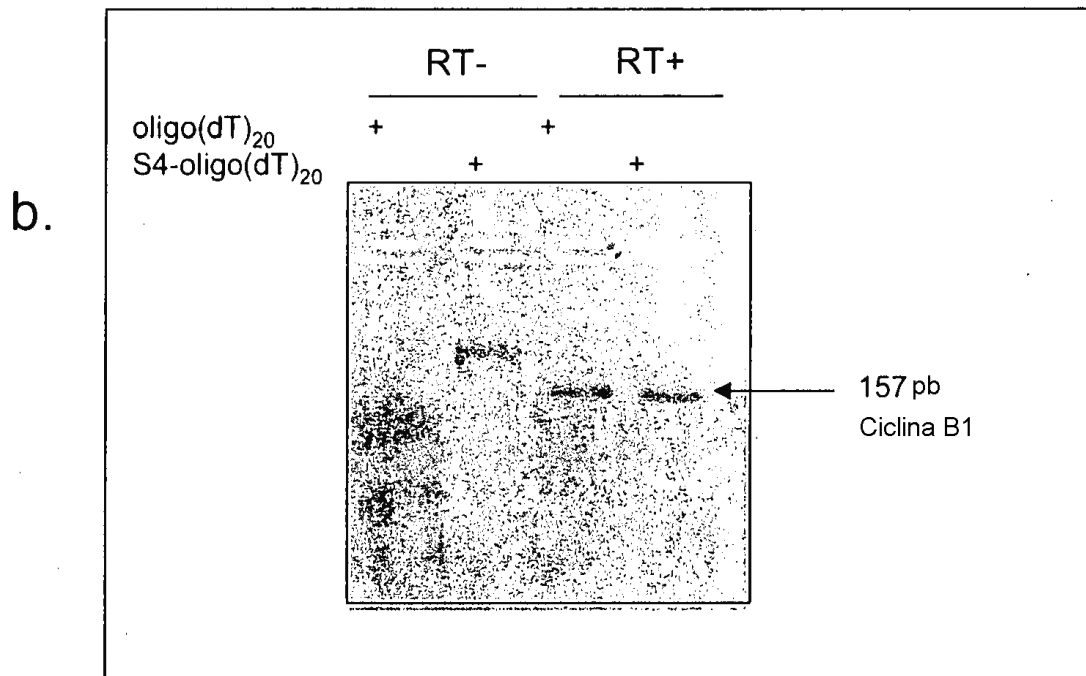
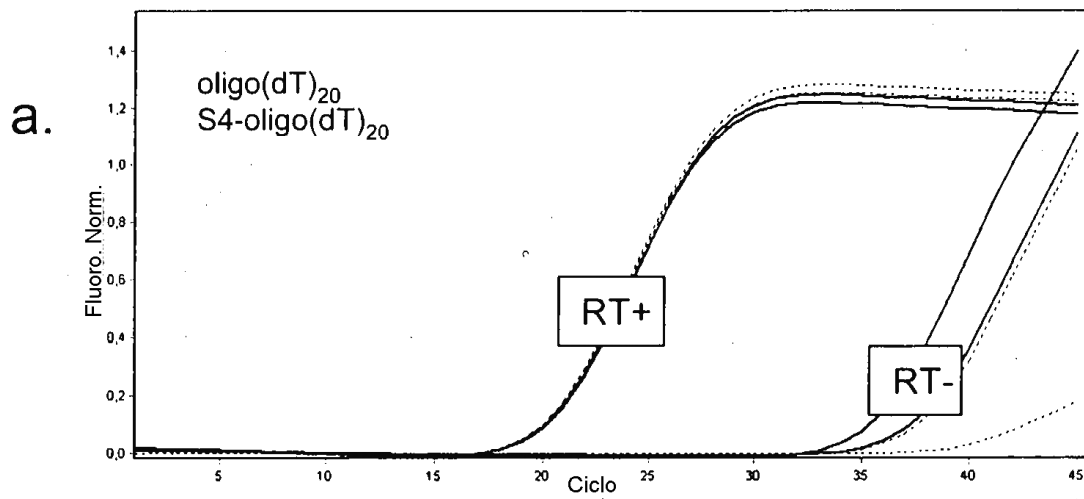
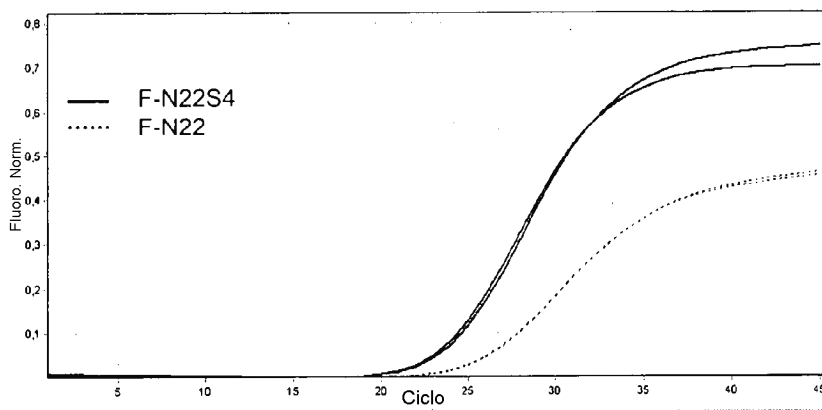


Figura 7

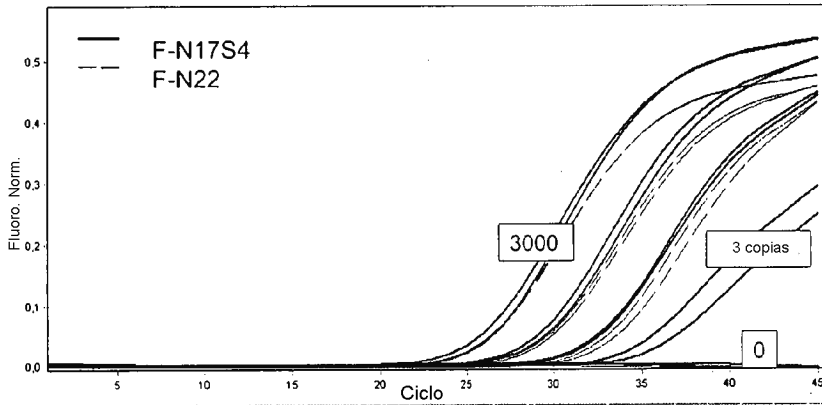
a.

Sonda	Fluorescencia de fondo pura
F-N22S4	4,8
F-N22	24

b.



c.



d.

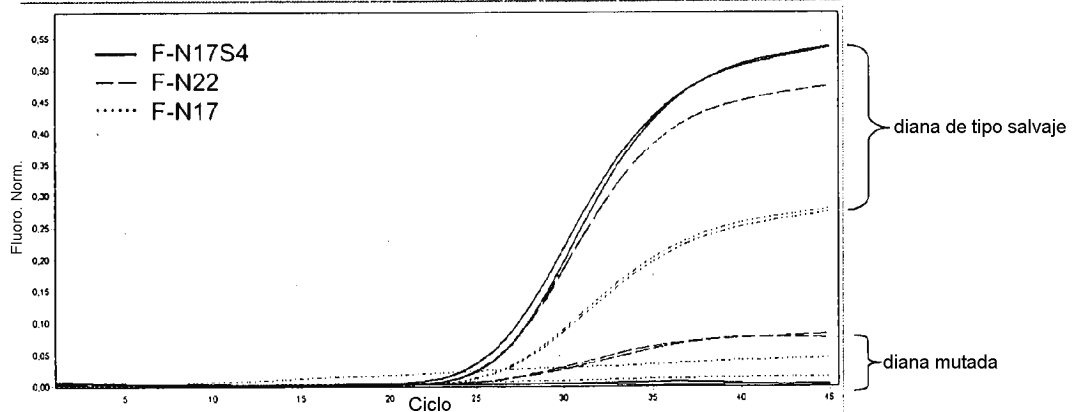
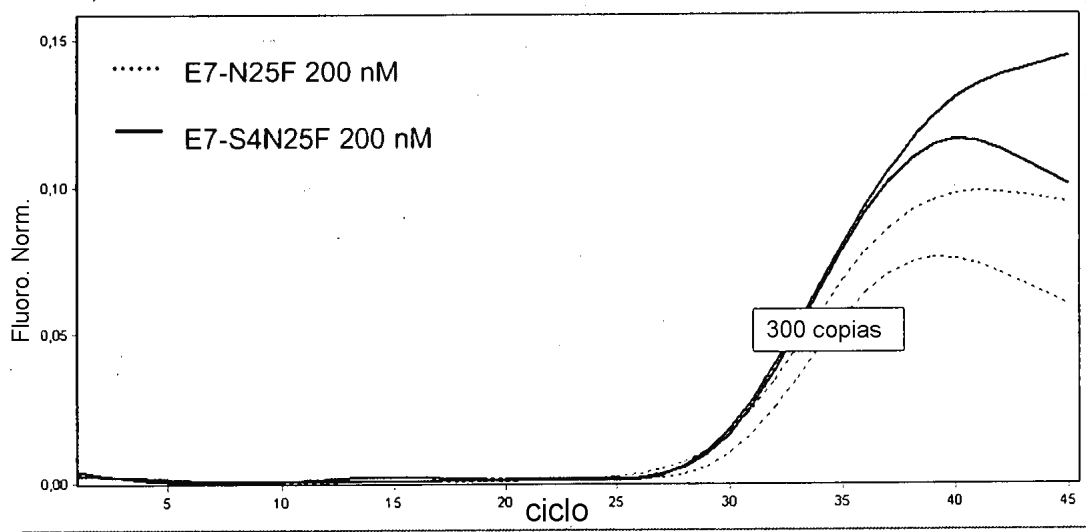


Figura 8

a.



b.

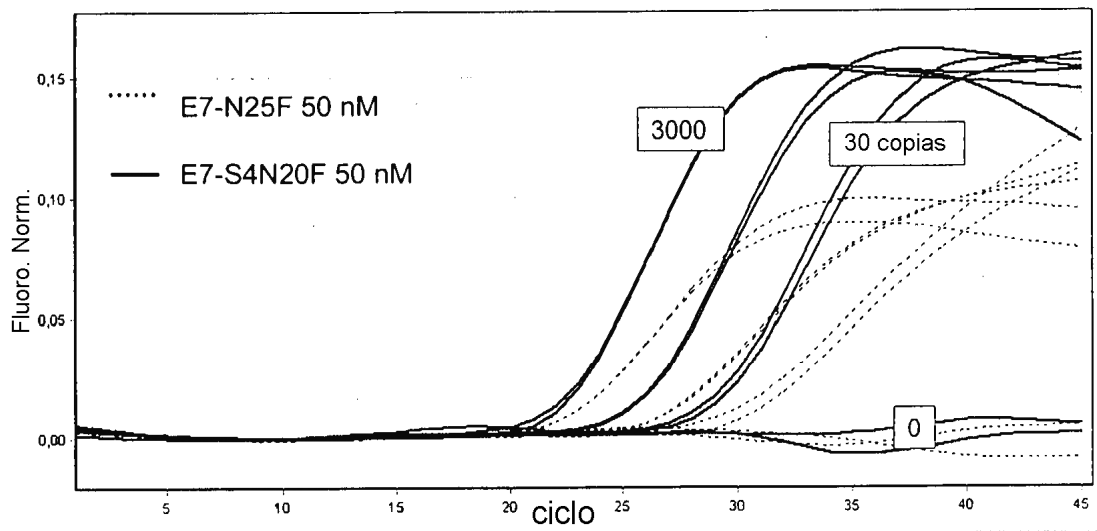


Figura 9

