

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2010 PCT/EP2010/004963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11018232**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2010 E 10745171 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2464745**

54 Título: **Formato de sondas para detectar diferencias de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

14.08.2009 US 234189 P

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

11.04.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

WILL, STEPHEN GORDON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Marta

ES 2 608 455 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

Formato de sondas para detectar diferencias de ácidos nucleicos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Un polimorfismo de nucleótido único (PNU) es una mutación de un solo par de bases en un sitio específico en una secuencia de ADN genómico. Los PNU son responsables de la mayoría de las variaciones en el ADN entre dos individuos cualesquiera. Los PNU pueden predisponer a un individuo a desarrollar una determinada enfermedad o a responder a un fármaco de manera diferente. Por lo tanto, puede utilizarse la detección de los PNU para monitorizar condiciones genéticas.

15 También se producen variaciones génicas y mutaciones en los patógenos, tales como los virus y las bacterias. La detección de las variaciones génicas y las mutaciones puede utilizarse para distinguir patógenos y, en algunos casos, puede ayudar a realizar un pronóstico y a predecir el curso de tratamiento. En las células somáticas también se producen mutaciones en bases individuales, por ejemplo durante el desarrollo y progresión del cáncer. La detección de estas mutaciones ayuda a predecir la respuesta a la terapia.

20 BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos de detección de la presencia o la ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra biológica. Un método según la presente invención comprende:

25 a. poner en contacto una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador con la muestra, y

b. detectar la presencia o la ausencia de unión de la sonda al ácido nucleico diana,

30 en el que los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior a 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido y ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y en el que

(i) la sonda no es extensible por una polimerasa,

35 (ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras,

40 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y

45 (iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana.

50 Según una realización de la presente invención, el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras, y el dominio de anclaje y el dominio informador comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 10 nucleótidos complementaria a una cadena del ácido nucleico diana.

55 En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende medir la temperatura de fusión de un complejo formado entre el dominio informador y el ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 4 y 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 6 y 12 nucleótidos.

60 En algunas realizaciones, la región de anclaje es de entre 6 y 40 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el marcaje es un marcaje fluorescente. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la sonda y la muestra con un inhibidor intercalante soluble de manera que el inhibidor altera la fluorescencia del marcaje al formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.

65 En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico o microbiano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico humano

comprende un polimorfismo de nucleótido único (PNU) o una mutación y el dominio informador es 100% complementario a un alelo del PNU o de la mutación.

5 En algunas realizaciones, la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador respecto a la de un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.

En algunas realizaciones, el conector es polietilenglicol. En algunas realizaciones, el conector es hexaetilenglicol.

10 La presente invención proporciona además mezclas de reacción para la detección de la presencia o la ausencia de una secuencia diana. Una mezcla de reacción según la presente invención comprende:

a. un ácido nucleico diana que comprende una región de unión a anclaje y una región de unión a informador, y

15 b. una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador,

en el que los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior a 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido y ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y en el que:

20 (i) la sonda no es extensible por una polimerasa,

25 (ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras,

30 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y

(iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana.

35 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además nucleósidos trifosfato, una ADN polimerasa y/o un cebador oligonucleótido.

En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 4 y 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 6 y 12 nucleótidos.

40 En algunas realizaciones, el dominio de anclaje es de entre 6 y 40 nucleótidos.

45 En algunas realizaciones, el marcaje es un marcaje fluorescente. En algunas realizaciones, un inhibidor intercalante soluble en el que el inhibidor altera la fluorescencia del marcaje al formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.

50 En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico o microbiano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico humano comprende un polimorfismo de nucleótido único (PNU) o una mutación y el dominio informador es 100% complementario a un alelo del PNU o de la mutación.

55 En algunas realizaciones, la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador respecto a la de un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.

En algunas realizaciones, el conector es polietilenglicol. En algunas realizaciones, el conector es hexaetilenglicol.

60 La presente invención se refiere además a una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador, en la que:

los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior al 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido,

65 ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y

en la que:

(i) la sonda no es extensible por una polimerasa, y

5 (ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras,

10 En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 4 y 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 6 y 12 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el dominio de anclaje es de entre 6 y 40 nucleótidos.

15 En algunas realizaciones, el marcaje es un marcaje fluorescente.

En algunas realizaciones, la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador respecto a la de un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.

20 En algunas realizaciones, el conector es polietilenglicol. En algunas realizaciones, el conector es hexaetilenglicol.

La presente invención proporciona además un kit para la detección de la presencia o la ausencia de una secuencia diana. El kit según la presente invención comprende:

25 a. una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador, en la que:

los dominios de anclaje e informador están unidos mediante un conector no nucleósido,

30 ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y

en la que:

35 (i) la sonda no es extensible por una polimerasa,

40 (ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras,

45 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y

(iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana.

50 b. uno o más reactivos seleccionados de entre el grupo que consiste de una sal, un tampón, un inhibidor de nucleasa, nucleósidos trifosfato, una ADN polimerasa y/o un cebador oligonucleótido.

En algunas realizaciones, el kit comprende además un inhibidor intercalante soluble de manera que el inhibidor altera la fluorescencia procedente del marcaje al formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.

55 En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 4 y 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 6 y 12 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el dominio de anclaje es de entre 6 y 40 nucleótidos.

60 En algunas realizaciones, el marcaje es un marcaje fluorescente.

En algunas realizaciones, la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador respecto a la de un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.

65

DEFINICIONES

Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un oligonucleótido" incluye una pluralidad de oligonucleótidos; la referencia a "una sonda" incluye mezclas de dichas sondas, y similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra biológica" se refiere a cualquier sustancia que contiene o que se cree que contiene ácidos nucleicos (por ejemplo de una bacteria, virus, biopsia de tejido, etc.). La muestra puede obtenerse por cualesquiera medios conocidos por el experto en la materia. Dicha muestra puede ser una cantidad de tejido o líquido, o una fracción purificada del mismo, aislada a partir de uno o más individuos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa, líquido espinal, saliva, líquido peritoneal, líquido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, productos sanguíneos, semen, líquido seminal, líquidos vaginales, efusión pulmonar, líquido seroso, lavado bronquioalveolar, tumores, tejidos incluidos en parafina, etc. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos in vitro, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, medio condicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc. Puede obtenerse un ácido nucleico a partir de una muestra biológica mediante procedimientos bien conocidos de la técnica. Una "secuencia diana de ácidos nucleicos" se refiere a una secuencia polinucleótida que debe detectarse en una muestra biológica. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, la región (una subsecuencia o secuencia) de un ácido nucleico que es total o parcialmente complementaria a la región hibridante de un dominio informado de una sonda de ácidos nucleicos tal como se indica en la presente memoria. La "secuencia diana" puede presentar cualquier longitud de por lo menos 3 nucleótidos. La secuencia diana puede ser una parte de una secuencia génica más grande u otra secuencia que debe detectarse.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan intercambiamente y se refieren a un polímero de monómeros de ácidos nucleicos de ribosa (ARN) o de ácidos nucleicos de desoxirribosa (ADN), o análogos de los mismos. Lo anterior incluye polímeros de nucleótidos, tales como ARN y ADN, así como formas modificadas de los mismos, ácidos péptido nucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y similares. En determinadas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómero, por ejemplo subunidades de tanto ARN como ADN. Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla o de doble cadena, o híbridos ADN:ARN, o estructuras químicas de ADN y ARN. No se pretende realizar ninguna distinción de longitud entre la expresión "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido", y las expresiones pueden utilizarse intercambiamente en la presente memoria a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Un ácido nucleico es típicamente de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se indica de manera general en la presente memoria, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925, 1993, y referencias citadas en la misma, Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800, 1970; Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81, 579, 1977; Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14: 3487, 1986; Sawai et al., *Chem. Lett.* 805, 1984; Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470, 1988; y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:1419, 1986), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosforoamidita (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1992), y esqueletos y enlaces de ácido péptido-nucleico (Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895, 1992; Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008, 1992; Nielsen, *Nature* 365:566, 1993, y Carlsson et al., *Nature* 380:207, 1996). Entre otros análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos con esqueletos cargados positivamente (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097, 1995), esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; *Angew Chem. Intl. Ed. English* 30: 423, 1991; Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470, 1988; Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395, 1994; Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17, 1994; *Tetrahedron Lett.* 37:743, 1996) y esqueletos no ribosídicos, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos (Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.*, páginas 169 a 176, 1995). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. y E. *News*, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden llevarse a cabo para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como marcapjes, o para alterar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en medios fisiológicos.

Además, de dichas bases heterocíclicas naturales que se observan típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), entre los análogos de ácidos nucleicos también se incluyen los que

presentan bases heterocíclicas no naturales u otras bases modificadas, muchas de las cuales se indican, o se hace referencia a ellas de otra manera, en la presente memoria. En particular, se describen en mayor detalle muchas bases no naturales en, por ejemplo, Seela et al., *Helv. Chim. Acta* 74:1790, 1991; Grein et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, 1994; y Seela et al., *Helv. Chim. Acta* 82:1640, 1999. A título ilustrativo adicional, se incluyen opcionalmente determinadas bases utilizadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_f). Por ejemplo, entre algunas de ellas se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, patente US nº 5.990.303, titulada "Synthesis of 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleotides" [Síntesis de nucleótidos 7-deaza-2'-desoxiguanosina], concedida el 23 de nov. de 1999 a Seela. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 7-deazaadenina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 7-deazaguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil-éster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinilpirimidina y similares.

También se indican ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados en, por ejemplo, la patente US nº 5.484.908, titulada "Oligonucleotides containing 5-propynyl pyrimidines" [Oligonucleótidos que contienen 5-propinilpirimidinas], concedida el 16 de enero de 1996 a Froehler et al.; la patente US nº 5.645.985, titulada "Enhanced triple-helix and double-helix formation with oligomers containing modified pyrimidines" [Formación potenciada de triple hélice y de doble hélice con oligómeros que contienen pirimidinas modificadas], concedida el 3 de nov. de 1998 a Froehler et al.; la patente US nº 6.639.059, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides" [Síntesis de [2.2.1]bicyclo-nucleósidos], concedida el 28 de oct. de 2003 a Kochkine et al.; la patente US nº 6.303.315, titulada "One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples" [Preparación de muestra y detección de ácidos nucleicos en una sola etapa en muestras biológicas complejas], concedida el 16 de oct. de 2001 a Skouv; patente US nº 6.001.611, titulada "Modified nucleic acid amplification primers" [Cebadores modificados de amplificación de ácidos nucleicos], concedida el 14 de dic. de 1999 a S. Will, y la publicación de patente US nº 2003/0092905, titulada "Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides" [Síntesis de [2.2.1]bicyclo-nucleósido], de Kochkine et al., publicada el 15 de mayo de 2003.

No se pretende que la presente invención se encuentre limitada por la fuente de los ácidos nucleicos, polinucleótidos u oligonucleótidos. Dichos ácidos nucleicos pueden proceder de un mamífero humano o no humano, o de cualquier otro organismo (por ejemplo planta, anfibio, bacteria, virus, micoplasma, etc.), tejido o línea celular o derivado procedente de cualquier fuente recombinante, sintetizado in vitro o mediante síntesis química. Nuevamente el ácido nucleico puede ser de ADN, ARN, ADNc, ADN-ARN, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos péptidos nucleicos (APN), un híbrido o cualquier mezcla de los anteriores. Los ácidos nucleicos pueden encontrarse presentes en una forma de doble cadena, de cadena sencilla o parcialmente de doble cadena. Entre los ácidos nucleicos de la invención se incluyen ambos ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico tal como microorganismos, por ejemplo bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos, micoplasmas y similares.

La expresión "extensión de un cebador" se refiere a la capacidad de un biocatalizador incorporador de nucleótidos, tal como una polimerasa, de añadir nucleótidos al extremo 3' de un cebador de una manera específica de molde. Un cebador es no extensible en el caso de que, por ejemplo, el extremo 3' del cebador se encuentre bloqueado.

La expresión "condiciones de extensión de la reacción en cadena de la polimerasa" se refiere a condiciones bajo las que los cebadores que se hibridan con un ácido nucleico molde son extendidos por una polimerasa durante una etapa de hibridación de reacción en cadena de polimerasa (PCR). El experto en la materia apreciará que dichas condiciones pueden variar y están generalmente influidas por la fuerza iónica y la temperatura. Se describen diversas condiciones de hibridación por PCR, en por ejemplo, *PCR Strategies* (M.A. Innis, D.H. Gelfand y J.J. Sninsky, editores, Academic Press, San Diego, CA, 1995) en el capítulo 14: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

La expresión "nucleótido natural" se refiere a nucleótidos de tipo purina y pirimidina presentes en el ADN celular (por ejemplo citosina (C), adenina (A), guanina (G) y timina (T)) y en el ARN celular (por ejemplo citosina (C), adenina (A), guanina (G) y uracilo (U)).

La expresión "nucleótido no natural" o "nucleótido modificado" se refiere a una unidad en un polímero de ácidos

nucleicos que contiene una base modificada, un grupo sacárido o fosfato, o que incorpora una fracción no natural en su estructura. Por ejemplo, la base, sacárido o fosfato de un nucleótido no natural puede modificarse según las modificaciones indicadas anteriormente para análogos de ácidos nucleicos. El nucleótido no natural puede producirse mediante una modificación química del nucleótido como parte del polímero de ácidos nucleicos o antes de la incorporación del nucleótido modificado en el polímero de ácidos nucleicos. En otro enfoque, puede producirse un nucleótido no natural mediante la incorporación de un nucleósido trifosfato modificado en la cadena de polímero durante una reacción de amplificación. Entre los ejemplos de nucleótidos no naturales, a título ilustrativo y no limitativo, se incluyen dideoxinucleótidos, derivados o análogos que están biotinilados, modificados con amina, alquilados, marcados con fluoróforo y similares, y entre ellos también se incluyen fosforotioato, fosfito, derivados en átomos anulares, y similares.

Un ácido nucleico es "complementario" en relación a otro ácido nucleico en el caso de que por lo menos un segmento de ácidos nucleicos (es decir, por lo menos dos bases contiguas) pueda combinarse en una asociación antiparalela o hibridarse con por lo menos una subsecuencia de otro ácido nucleico para formar un dúplex. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo en forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como en el caso de que dos o más ácidos nucleicos de cadena sencilla se hibriden entre sí. En el contexto de la presente invención, para un oligonucleótido que es "totalmente complementario" a una secuencia particular, cada base del oligonucleótido es complementario a las bases correspondientes en la secuencia particular de una manera antiparalela. Pueden incluirse en los ácidos nucleicos de la presente invención determinadas bases no observadas comúnmente en los ácidos nucleicos naturales y entre las cuales se incluyen, por ejemplo, 7-deazaguanina y los comentados anteriormente. En algunas realizaciones, la complementariedad no es perfecta (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser "parcialmente complementarios" y no "totalmente complementarios"). Los dúplex estables, por ejemplo, pueden contener pares de bases incorrectamente apareados o bases no apareadas. La expresión "sustancialmente complementario" se refiere a una secuencia que es por lo menos 80% complementario (por ejemplo por lo menos 80%, 85%, 90% o 95%) respecto a una secuencia de unión potencial. En donde no se indique, la expresión se refiere al grado de complementariedad en toda la longitud de la secuencia de unión potencial.

Un "ácido nucleico cebador" o "cebador" es un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico diana o molde y permitir la extensión o elongación de cadena utilizando, por ejemplo, un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa bajo condiciones de reacción apropiadas. Entre dichas condiciones típicamente se incluyen la presencia de uno o más desoxirribonucleósidos trifosfato y el biocatalizador incorporador de nucleótidos en un tampón adecuado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan al pH, fuerza iónica, etc.) y a una temperatura adecuada. Un ácido nucleico cebador típicamente es un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla, etc.). Aunque se utilizan opcionalmente otras longitudes de ácido nucleico cebador, típicamente comprenden regiones hibridantes de longitudes de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos de molde. Un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para hibridarse con el molde para que pueda producirse la extensión. El diseño de cebadores adecuados para, por ejemplo, la amplificación de una secuencia diana dada es bien conocido de la técnica y se describe en la literatura citada en la presente memoria. Un ácido nucleico cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante, por ejemplo, medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos, u otras técnicas. A título ilustrativo, entre los marcajes se incluyen isótopos radioactivos, pigmentos fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (tales como los utilizados comúnmente en los ensayos de ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se dispone de antiseros o anticuerpos monoclonales. Muchos de dichos marcajes y otros marcajes se describen adicionalmente en la presente memoria y/ conocidos de otra manera en la técnica. El experto en la materia reconocerá que, en determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos cebadores también pueden utilizarse como ácidos nucleicos sonda.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (u otra secuencia de ácidos nucleicos) que puede formar una estructura dúplex con una región de un ácido nucleico diana (o amplicón derivado de dicho ácido nucleico diana) debido a la complementariedad parcial o completa de por lo menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el ácido nucleico diana bajo condiciones adecuadas. Tal como se define en la presente memoria, la sonda puede comprender además componentes no nucleótidos, por ejemplo un conector no nucleósido. Tal como se comenta en la presente memoria, la sonda puede utilizarse con marcaje o sin marcaje. El extremo 3'-terminal de la sonda opcionalmente puede diseñarse para prohibir la incorporación de la sonda en un producto de extensión de cebador (no extensible). Lo anterior puede conseguirse mediante la utilización de bases no complementarias o mediante la adición de una fracción química, tal como biotina o un grupo fosfato, al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido, que puede, dependiendo de la fracción seleccionada, servir a un doble propósito, al actuar también como marcaje para la detección o captura posterior del ácido nucleico unido al marcaje. La prohibición de la extensión también puede conseguirse eliminando el grupo 3'-OH o mediante la utilización de un nucleótido que no presenta un 3'-OH, tal como un dideoxinucleótido, o mediante la adición de un grupo voluminoso que bloquee la extensión mediante un impedimento estérico. Los polinucleótidos también pueden convertirse en no extensibles, por ejemplo mediante la modificación del extremo 2' del polinucleótido, por ejemplo con un fosfato u otra

fracción, tal como se indica en, por ejemplo, cualquiera de las publicaciones de patente US nº 2005/0037991 y nº 2007/0154914.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "tallo-bucle" se refiere a una estructura secundaria que comprende una parte de tallo y una parte de bucle no apareada. Según la presente invención, el tallo está formado por dos regiones complementarias de un ácido nucleico de cadena sencilla. La parte tallo de un tallo-bucle puede estar formada de dos regiones de un único ácido nucleico, en el que una de las 2 regiones comprende por lo menos 3 (por ejemplo por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7 o más) bases 100% complementarias a la otra de las dos regiones, permitiendo de esta manera la formación del dúplex tallo bajo 10 condiciones apropiadas. Las bases intermedias entre las dos regiones pueden formar un bucle no apareado, que comprende, por ejemplo, por lo menos tres, por lo menos cinco, por lo menos siete, por lo menos diez o por lo menos 20 o más bases.

15 La expresión "región hibridante" se refiere a aquella región de por lo menos 3 nucleótidos contiguos de longitud de un ácido nucleico que es exacta o sustancialmente complementario a, y que por lo tanto se hibrida con, un polinucleótido.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término " T_f " se refiere a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que la mitad de una población de polinucleótidos u oligómeros nucleobases de doble cadena (por ejemplo complejos de hibridación), en homodúplex o heterodúplex (es decir, dúplex que son completa o parcialmente complementarios), se disocian en cadenas sencillas (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos). La predicción de la T_f de un polinucleótido dúplex considera que la secuencia de bases, así como otros factores, incluyendo las características estructurales y de secuencia y la naturaleza de los enlaces oligoméricos. Los métodos para predecir y determinar experimentalmente la T_f son conocidos de la técnica.

25 Por ejemplo, tradicionalmente se determina la T_f mediante una curva de fusión, en la que se calienta una molécula dúplex de ácidos nucleicos en un programa de temperatura controlada, y se realiza un seguimiento y se representa gráficamente del estado de asociación/disociación de las dos cadenas sencillas hasta alcanzar una temperatura a la que las dos cadenas están completamente disociadas. Se determina la T_f a partir de dicha curva de fusión. 30 Alternativamente, puede determinarse la T_f con una curva de hibridación, en la que se calienta una molécula dúplex de ácidos nucleicos hasta una temperatura a la que las dos cadenas se encuentran completamente disociadas. A continuación, se baja la temperatura en un programa de temperatura controlada, y se realiza un seguimiento y se representa gráficamente el estado de asociación/disociación de las dos cadenas sencillas en el dúplex hasta alcanzar una temperatura a la que las dos cadenas se encuentran completamente apareadas. A continuación, se 35 determina la T_f a partir de dicha curva de hibridación.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "marcado detectablemente" o "marcaje detectable" se refiere a una especie química que puede detectarse o que puede conducir a una respuesta detectable. Los marcajes detectables según la invención pueden unirse a una sonda directa o indirectamente. En algunas realizaciones, los marcajes detectables son elementos de una pareja de marcajes interactiva. En algunas otras realizaciones, un elemento de la pareja de marcaje es un fluoróforo y el otro elemento de la pareja de marcaje es un inhibidor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 FIG. 1:

(A) en el caso de que el dominio informador sea 100% complementario al ácido nucleico diana, se hibrida al ácido nucleico diana. Tal como se muestra en la figura, la secuencia del ácido nucleico diana contiene un polimorfismo de nucleótido único (PNU) y el dominio informar es 100% complementario a la secuencia diana que contiene el PNU. 50

(B) En el caso de un apareamiento incorrecto de PNU, por ejemplo la secuencia diana de ácidos nucleicos contiene alelos variantes o alternativos del PNU, el dominio informador no se hibrida con el ácido nucleico diana. 55

FIG. 2: otra realización de la sonda marcada de la presente invención. Tal como se muestra en la figura, se une un pigmento fluorescente al extremo 5'-terminal del dominio informador y se une un pigmento inhibidor al extremo 5' del dominio de anclaje.

60 FIG. 3: otra realización de la sonda marcada de la presente invención. Tal como se muestra en la figura, se une un pigmento fluorescente al extremo 5'-terminal del dominio informador y se une un pigmento inhibidor al extremo 3' del dominio informador.

65 FIG. 4: otra realización de la sonda marcada de la presente invención. Tal como se muestra en la figura, se une un pigmento fluorescente al extremo 5'-terminal del dominio informador y se utiliza un pigmento inhibidor intercalante soluble.

FIG. 5: se generaron diversas versiones de la sonda Cobra con o sin bases estabilizadoras, de la manera siguiente: 5NS-CBRA-USRV no contiene bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases; 6ST-CBRA-USRV contiene 7 bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases, y 7ST-CBRA-USRV contiene 7 bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases pero ninguna base estabilizadora en el centro de la región informadora correspondiente a la región variable en el molde.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 I. Introducción

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una sonda de dos dominios que presenta un conector flexible permite la detección específica de la presencia o ausencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos. El primer dominio sirve como "anclaje" que controla la hibridación de la sonda en el ácido nucleico diana. Dicho dominio se hibrida con el ácido nucleico diana establemente y es tolerante a potenciales apareamientos incorrectos, o se diseña para formar un dúplex con una región que presenta baja variabilidad dentro de la región complementaria (región de "unión a anclaje") del ácido nucleico diana. El segundo dominio sirve como "informador" que está diseñado para detectar la secuencia de interés. El "informador" es altamente específico para la región complementaria del ácido nucleico diana (región "de unión a informador") y es capaz de detectar la presencia o la ausencia de la secuencia diana, así como de diferenciar la correspondencia/no correspondencia con la región de unión a informador. El dominio informador generalmente se une a un marcaje de manera que puede distinguirse la hibridación y la falta de hibridación del dominio informador, detectando de esta manera la presencia o la ausencia de la secuencia diana, o detectando alteraciones de la temperatura de fusión, detectando de esta manera los apareamientos incorrectos en la región de la sonda. La sonda de dos dominios de dicho diseño permite una detección altamente específica de una secuencia diana de interés.

La presente invención proporciona además métodos para detectar un ácido nucleico diana con las sondas de dos dominios. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los métodos de la presente invención resultan útiles en numerosas aplicaciones, incluyendo, aunque sin limitación a ellos, diagnósticos moleculares, agricultura, ensayo de alimentos, cultivos/cría de ganado, identificación de patógenos, identificación/desarrollo de fármacos y farmacogenómica. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden utilizarse en la detección de variantes particulares de un virus o la detección de una secuencia de ácidos nucleicos que comprenden un polimorfismo de nucleótido único o una mutación puntual en diversos organismos.

Los métodos de la técnica anterior apropiados para detectar la presencia o la ausencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos en una muestra biológica habitualmente comprenden poner en contacto la muestra con una sonda detectablemente marcada que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje (dominio de unión a diana) y un dominio de ácidos nucleicos informador (dominio de cierre de diana), en el que los dominios de anclaje e informador son sustancialmente complementarios entre sí y, por lo tanto, deben formar una estructura de tallo-bucle entre sí en ausencia del ácido nucleico diana y, de esta manera, se reduce la unión de la sonda a la diana (documentos nº US 2005/0123988, nº WO 207/070542). El documento nº WO 2004/098386 describe sondas que comprenden un dominio de anclaje y un dominio de unión unidos mediante un dominio de puente que contiene bases universales y/o otras bases no naturales y/o bases naturales para detectar los PNU. Se indica además que el dominio de puente puede contener un conector no de ácidos nucleicos, tal como un espaciador 9, espaciador 18 o espaciador C3. Las sondas que comprenden dicho conector no de ácidos nucleicos, sin embargo, funcionan peor que las sondas que comprenden bases universales en el dominio de puente. Las sondas que contienen un dominio complementario a otra sonda pero no la misma cadena del ácido nucleico diana se describen, por ejemplo, en el documento nº WO 02/02817.

El documento nº WO 2008/066730 describe la utilización de una sonda marcada en combinación con un oligómero de ADN-ADN que comprende un conector amino C6, un conector no nucleósido, que une el APN con el oligómero de ADN. Sin embargo, los oligómeros de APN-ADN indicados ni comprenden un marcaje ni una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana adecuado para permitir la unión selectiva a una forma de un PNU. Los oligómeros de APN-ADN indicados son extensibles or una polimerasa al hibridarse con el ácido nucleico diana.

II. Sondas

La presente invención se refiere a una sonda que comprende un dominio de ácidos nucleicos informador y un dominio de ácidos nucleicos informador que presenta una complementariedad inferior al 50% y que comprende además un conector no nucleósido para unir los dos dominios. Por conveniencia, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje también puede denominarse "primer dominio" y el dominio de ácidos nucleicos informador también puede denominarse "segundo dominio". La sonda de la presente invención se diseña para marcarse detectablemente con el fin de detectar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico diana, es decir, de manera que se produce un cambio de señal procedente del marcaje al hibridarse el dominio informador con la diana, en comparación con la no hibridación del informador con la diana. Mediante la detección y la medición del cambio de la señal detectable, la

presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácidos nucleicos puede determinarse cualitativa o cuantitativamente. Mediante la detección de alteraciones de la temperatura de fusión, puede determinarse la presencia o la ausencia de mutaciones o alteraciones de la diana.

5 El dominio de anclaje de la invención está diseñado para hibridarse con una secuencia "de unión a anclaje" del ácido nucleico diana bajo las condiciones del ensayo. En contraste, el dominio informador puede hibridarse o no con su "región de unión" diana dependiendo de si se encuentra presente la secuencia diana exacta. El dominio informador puede diseñarse para que, por ejemplo, sea complementario o por lo menos sustancialmente complementario a una secuencia "de unión a informador" de un ácido nucleico diana. Dependiendo de las condiciones de reacción
10 utilizadas, puede distinguirse la hibridación del dominio informador con la diana frente a la hibridación con una secuencia variante diana.

La sonda utilizada según la presente invención se convierte en no extensible de manera que no pueden añadirse nucleótidos adicionales a la sonda. La sonda puede convertirse en no extensible, por ejemplo mediante la
15 modificación del extremo 3' de la sonda de manera que el grupo hidroxilo ya no es capaz de participar en la elongación. El grupo hidroxilo de un nucleótido natural 3' simplemente puede modificarse con una diversidad de grupos funcionales. Por ejemplo, el extremo 3' de la sonda puede convertirse en no extensible mediante la incorporación de un análogo de nucleótido que no presenta un grupo 3'-hidroxilo o no puede funcionar como sustrato de una polimerasa para la extensión. Opcionalmente, la sonda puede convertirse en no extensible mediante la
20 incorporación de un marcaje en su extremo 3'.

En algunas realizaciones, la sonda puede convertirse en no extensible mediante la incorporación de un nucleótido terminador 2', un análogo de nucleótido que presenta un grupo de bloqueo en la posición 2' de la fracción sacárida del nucleótido. Un "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo o fracción química que típicamente impide la extensión
25 de un ácido nucleico (es decir, un nucleótido terminador 2' típicamente es no extensible por uno o más biocatalizadores incorporadores de nucleótidos). Es decir, tras incorporar un nucleótido terminador 2' en un ácido nucleico (por ejemplo en el extremo 3' del ácido nucleico), el grupo de bloqueo evita la extensión adicional de un ácido nucleico por como mínimo un biocatalizador que incorpora nucleótidos. Entre los biocatalizadores incorporadores de nucleótidos ejemplares se incluyen ADN polimerasas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, por
30 ejemplo, una ADN polimerasa G46E E678G CS5, una ADN polimerasa G46E L329A E678G CS5, una ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F CS5, una ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F E678G CS5, una ADN polimerasa G46E E678G CS6, una polimerasa ΔZO5R, una ADN polimerasa Taq E615G, una polimerasa de *Thermus flavus*, una polimerasa TMA-25, una polimerasa TMA-30, una ADN polimerasa Tth, una polimerasa SPS-17 de especie de *Thermus*, una polimerasa Taq E615G, una polimerasa de *Thermus* Z05R, una ADN polimerasa de T7,
35 una ADN polimerasa I Kornberg, una ADN polimerasa Klenow, una ADN polimerasa Taq, una ADN polimerasa microcócica, una ADN polimerasa alfa, una transcriptasa inversa, una transcriptasa inversa del VMA, una transcriptasa inversa del VLMu-M, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una ARN polimerasa de *E. coli*, una ARN polimerasa SP6, una ARN polimerasa T3, una ADN polimerasa de T4, una ARN polimerasa de T7, una ARN polimerasa II, una transferasa terminal, una polinucleótido fosforilasa, una ADN polimerasa incorporadora de ribonucleótidos, y similares.
40

Un grupo de bloqueo ejemplar es un grupo fosfato. Entre los nucleótidos terminadores 2' ejemplares se incluyen los nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato y los nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-difosfato. Se indican otros nucleótidos terminadores 2' en, por ejemplo, las solicitudes publicadas de patente US nº 2005/0037991,
45 titulada "Synthesis and compositions of 2'-terminator nucleotides" [Síntesis y composiciones de nucleótidos terminadores 2'], la publicación nº 2005/0037398, titulada "2'-Terminator nucleotide-related methods and systems" [Métodos y sistemas relacionados con nucleótidos terminadores 2'] y la solicitud publicada de patente US nº 2007/0154914, titulada "2'-Terminator related pyrophosphorolysis activated polymerization" [Polimerización activada mediante pirofosforólisis relacionada con terminadores 2'].
50

Según la presente invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje y el dominio de ácidos nucleicos informador están unidos mediante un conector no nucleósido. Puede utilizarse cualquier técnica estándar para unir el dominio de ácidos nucleicos de anclaje o el dominio de ácidos nucleicos informador al conector no nucleósido. El dominio de ácidos nucleicos de anclaje o el dominio de ácidos nucleicos informador pueden unirse al conector no nucleósido
55 directa o indirectamente. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje o el dominio de ácidos nucleicos informador se unen covalentemente al conector no nucleósido.

A. El dominio de ácidos nucleicos de anclaje

60 El dominio de ácidos nucleicos de anclaje de la presente invención está diseñado para unirse a una secuencia "de unión a anclaje" del ácido nucleico diana en una muestra biológica bajo las condiciones del ensayo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede diseñarse para que comprenda una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia "de unión a anclaje" del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje comprende o
65 consiste de una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia "de unión a anclaje" dentro del ácido nucleico diana. Las regiones complementarias pueden presentar cualquier longitud útil para

la invención, incluyendo, aunque sin limitación, por lo menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 o más nucleótidos, por ejemplo de una longitud de entre 3 y 50, de entre 5 y 20, de entre 5 y 50 o de entre 8 y 25 nucleótidos.

En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede comprender regiones adicionales, por ejemplo una región para la unión de marcajes detectables. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje contiene únicamente una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia "de unión a anclaje" del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede contener dos o más regiones, cada una se une a una secuencia "de unión a anclaje" diferente dentro del ácido nucleico diana.

Según la presente invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje (o primer dominio) está diseñado para controlar la hibridación de la sonda al ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la composición y la longitud del dominio de ácidos nucleicos de anclaje se selecciona para superior (es decir, se hibrida bajo las condiciones del método a pesar de potenciales apareamientos incorrectos entre el dominio de ácidos nucleicos de anclaje y la secuencia "de unión a anclaje" debido a polimorfismos infrecuentes dentro de la secuencia "de unión a anclaje". Según la presente invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede ser de cualquier longitud con la condición de que las afinidades entre el dominio de ácidos nucleicos de anclaje y la secuencia "de unión a anclaje" resulte suficientemente grande para que se hibriden bajo las condiciones de reacción. En algunas realizaciones, la longitud del dominio de ácidos nucleicos de anclaje se selecciona para que exista suficiente especificidad entre la sonda y el ácido nucleico diana de manera que se hibriden bajo las condiciones de reacción. Según la presente invención, la hibridación entre el dominio de ácidos nucleicos de anclaje y la secuencia "de unión a anclaje" por sí sola (es decir, se hibride o no el dominio informador con la diana) resulta suficiente para controlar la hibridación de la sonda con la localización deseada del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre aproximadamente cinco nucleótidos y aproximadamente 200 nucleótidos. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre 4 y 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre 6 y 40 nucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre 20 y 40 nucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre 8 y 25 nucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos. En otras realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud de entre 40 y 60 nucleótidos. En algunas otras realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje presenta una longitud superior a 60 nucleótidos. Preferentemente, el dominio de anclaje comprende una secuencia contigua con por lo menos 10 nucleótidos complementarios a una cadena del ácido nucleico diana.

El dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede comprender nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales o combinaciones de los mismos. Entre los ácidos nucleicos ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ácido ribonucleico (ARN) convencional, ácido desoxirribonucleico (ADN) y análogos químicos de dichas moléculas, tales como un análogo de nucleótido bloqueado ("ANB") y un ácido péptido nucleico ("APN"). Diversos análogos de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para el dominio de ácidos nucleicos de anclaje. En algunas realizaciones de la invención, el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio de anclaje en comparación con un nucleótido natural correspondiente en lugar del nucleótido no natural. Se indican en la técnica bases artificiales ejemplares que contribuyen a una T_f incrementada, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo Lebedev et al., Genetic Analysis-Biomolecular Engineering 13:15-21, 1996; Xodo et al., Nucleic Acids Res. 19:5625-5631, 1991; Froehler et al., Tetrahedron Lett. 33:5307-5310, 1992; Kutyavin et al., Biochemistry 35:11170-11176, 1996; Nguyen, et al., Nucleic Acids Res. 25:30599-65, 1997. En algunas realizaciones de la invención, los nucleótidos no naturales son propinil-dN. En algunas realizaciones de la invención, se sustituye la timina por propinil-dU; la citosina se sustituye por propinil-dC.

B. El dominio de ácidos nucleicos informador

El dominio de ácidos nucleicos informador de la presente invención está diseñado para la detección de la presencia o la ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra biológica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el dominio de ácidos nucleicos informador puede diseñarse para que comprenda una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia "de unión a informador" del ácido nucleico diana. Tal como se comenta en la presente memoria, el dominio de unión a anclaje de la diana y el dominio de unión a informador de la diana se encuentran en la misma diana del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos informador comprende o consiste de una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia "de unión a informador" dentro del ácido nucleico diana. En otras realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos informador comprende regiones adicionales, por ejemplo una región para la unión de marcajes detectables. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos informador contiene únicamente una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia "de unión a informador" del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos informador puede contener dos o más regiones, cada una de las cuales es capaz de hibridarse con una secuencia

"de unión a informador" diferente del ácido nucleico diana, por ejemplo múltiples regiones de PNU dentro del ácido nucleico diana.

5 Debido a que la secuencia del dominio informador está diseñada para ser selectiva para una secuencia específica de unión a dominio informador, generalmente la región del dominio informador es completamente complementario a la secuencia de unión a informador. Alternativamente, el dominio informador, en combinación con las condiciones de reacción, puede diseñarse de manera que el dominio informador se hibride con una diana específica o con la diana específica y con ligeras variantes (por ejemplo de un único nucleótido), pero que no se una a secuencias más ampliamente diferentes (por ejemplo deleciones o sustituciones más grandes, reorganizaciones, desapareamientos superiores a un solo nucleótido, etc.).

15 El dominio de ácidos nucleicos informador y el marcaje detectable pueden diseñarse para detectar la presencia o la ausencia de cualquier ácido nucleico diana de interés. El ácido nucleico diana puede ser de cualquier origen. Por ejemplo, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico o microbiano. Alternativamente, el ácido nucleico diana también puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico animal, de mamífero, humano, fúngico o vegetal. En algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos informador de la presente invención puede diseñarse para detectar la presencia o la ausencia de un polimorfismo de nucleótido único (PNU) o una mutación dentro del ácido nucleico diana. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en algunas realizaciones, el dominio de ácidos nucleicos informador comprende una región de unión que es 100% complementario a un alelo del PNU o la mutación y la sonda se utiliza bajo condiciones que permitan distinguir entre la unión al alelo y otros posibles alelos del PNU o la secuencia de tipo salvaje.

25 De esta manera, puede diseñarse el dominio de ácidos nucleicos informador para que resulte altamente específico para la secuencia "de unión a informador". En algunas realizaciones, incluso un desapareamiento de bases individuales entre el dominio de ácidos nucleicos informador y la secuencia "de unión a informador" puede inducir un cambio de señal, de naturaleza química o física, suficientemente significativa para facilitar la detección del apareamiento (o desapareamiento). El cambio de señal puede ser un cambio conformacional de la sonda, es decir, de una hélice aleatoria a un dúplex formado entre el dominio de ácidos nucleicos informador y el ácido nucleico diana. El cambio de señal puede ser física o químicamente detectable. Por ejemplo, la sonda puede marcarse fluorescentemente de manera que la señal de fluorescencia pueda inducirse o modificarse con un apareamiento o desapareamiento. El marcaje y la sonda puede diseñarse de manera que se detecta una diferencia de fluorescencia entre la hibridación y la no hibridación entre el dominio de ácidos nucleicos informador y la secuencia "de unión a informador". En algunas realizaciones, dicha diferencia no implica un tallo-bucle en cualquiera de los dominios de la sonda (por ejemplo en ausencia de diana). Dicho cambio de señal también puede ser un cambio en la temperatura de fusión del dúplex hibridante formado entre el dominio de ácidos nucleicos informador y la secuencia "de unión a informador". Puede medirse el cambio de la T_f , por ejemplo entre un dúplex complementario y un dúplex incorrectamente apareado formado entre el dominio de ácidos nucleicos informador y la secuencia "de unión a informador".

40 En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos informador comprende o consiste de una región que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia "de unión a informador" dentro del ácido nucleico diana. Las regiones complementarias pueden presentar cualquier longitud útil para la invención, incluyendo, aunque sin limitación, por lo menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 o más nucleótidos, por ejemplo de una longitud de entre 3 y 50, de entre 5 y 20, de entre 5 y 50 o de entre 8 y 25 nucleótidos.

45 El dominio de ácidos nucleicos informador de la presente invención puede presentar cualquier longitud adecuada. En algunas realizaciones, con el fin de maximizar la especificidad de su secuencia complementaria, el dominio de ácidos nucleicos informador de la presente invención está diseñado para ser de longitud relativamente corta. En algunas realizaciones, la longitud del dominio informador es de entre 4 y 20 nucleótidos; preferentemente, la longitud de la parte de unión a diana del dominio de ácidos nucleicos informador es de entre 4 y 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio de ácidos nucleicos informador es de entre 6 y 12 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio de ácidos nucleicos informador es de entre 8 y 25 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del dominio de ácidos nucleicos informador es de entre 6 y 40 nucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos informador presenta una longitud de por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos. Preferentemente, el dominio informador comprende una secuencia contigua con por lo menos 10 nucleótidos complementarios a una cadena del ácido nucleico diana.

60 La presente invención se beneficia de la elevada especificidad del dominio de ácidos nucleicos informador para la secuencia "de unión a informador". De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el dominio de ácidos nucleicos informador puede comprender un nucleótido no natural para incrementar la especificidad de unión del dominio de ácidos nucleicos informador y por lo tanto incrementar la diferenciación entre un apareamiento y una no correspondencia. En algunas realizaciones de la invención, el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador en comparación con un nucleótido natural correspondiente en lugar del nucleótido no natural. En algunas realizaciones de la invención, el nucleótido no natural incrementa la diferencia de T_f de un apareamiento y una no correspondencia. En algunas realizaciones de la invención, los nucleótidos no naturales son propinil-dN. Se indican en la técnica bases artificiales ejemplares que contribuyen a una T_f incrementada, incluyendo,

aunque sin limitación, por ejemplo Lebedev et al., Genetic Analysis-Biomolecular Engineering 13:15-21, 1996; Xodo et al., Nucleic Acids Res. 19:5625-5631, 1991); Froehler et al., Tetrahedron Lett. 33:5307-5310, 1992; Kutayavin et al., Biochemistry 35:11170-11176, 1996; Nguyen, et al., Nucleic Acids Res. 25:30599-65 (1997). Por ejemplo, la 2-amino-A incrementa la Tf en aproximadamente 3°C respecto a la A, la 5-metil-C incrementa la Tf en aproximadamente 1,3°C respecto a la C, la C-5-propinil-C mejora la Tf en aproximadamente 2,8°C respecto a la C y el C-5-propinil-U incrementa la Tf aproximadamente 1,7°C respecto a la T. Opcionalmente, la región informadora comprende una o más bases estabilizadoras (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más) pero una o ninguna base estabilizadora (por ejemplo no naturales) en la parte de la región informadora que se hibridará con una secuencia potencialmente variable (por ejemplo un PNU o posible mutación esperada).

El dominio de ácidos nucleicos de anclaje y el dominio de ácidos nucleicos informador no forman un tallo-bucle en ausencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de la invención, el dominio de ácidos nucleicos de anclaje y el dominio de ácidos nucleicos informador están diseñados para que no presenten ninguna estructura secundaria particular (por ejemplo una hélice aleatoria). Algunas regiones de dichos dominios pueden hibridarse entre sí. Por ejemplo, una región en el dominio de ácidos nucleicos de anclaje puede ser complementaria o parcialmente complementaria a una región en el dominio de ácidos nucleicos informador; los dominios de anclaje e informador según la presente invención presentan una complementariedad inferior al 50%. Otras sondas pueden presentar una estructura de tallo-bucle en ausencia de un ácido nucleico diana, formada entre regiones complementarias o parcialmente complementarias (por ejemplo regiones de por lo menos 4 nucleótidos contiguos) en el dominio de anclaje y/o el dominio informador.

Según la invención, ni el dominio de anclaje ni el dominio informador comprenden un tallo-bucle. De esta manera,

1. El dominio informador no incluye dos secuencias de por lo menos tres nucleótidos que son totalmente complementarias y en las que las dos secuencias presentan por lo menos dos nucleótidos intermedios, y/o

2. El dominio de anclaje no incluye dos secuencias de por lo menos tres nucleótidos que son totalmente complementarias y en las que las dos secuencias presentan por lo menos dos nucleótidos intermedios.

Tal como se ilustra en las figuras, el anclaje se encuentra en el extremo 3' de la sonda y el informador se encuentra en el extremo 5' de la sonda. Aunque las figuras ilustran realizaciones en las que el informador está unido al extremo 5' del dominio de anclaje, debe apreciarse que el informador también puede diseñarse para la unión al extremo 3' del dominio de anclaje (generando el informador en el extremo 3' de la sonda y el anclaje en el extremo 5' de la sonda).

C. El conector no nucleósido

Un "conector no nucleósido" separa el dominio de anclaje y el dominio informador. El experto en la materia reconocerá que puede utilizarse cualquier conector no nucleósido. Puede utilizarse experimentos rutinarios para determinar las características óptimas para el conector. Según la presente invención, el dominio de anclaje y el dominio informador están diseñados para unirse a regiones en el ácido nucleico diana contiguas entre sí. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el dominio de anclaje y el dominio informador pueden diseñarse para encontrarse relativamente próximas entre sí (por ejemplo con no más de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos intermedios al hibridarse los dominios informador y de anclaje con la diana). El conector generalmente será suficientemente flexible para permitir la hibridación del informador, o para no permitirla, en el caso de que el anclaje se hibride con una secuencia contigua en la diana. El conector no nucleósido funciona manteniendo el espaciado entre el dominio de anclaje y el dominio informador. Por lo tanto, el espaciado entre el dominio de anclaje y el dominio informador puede ajustarse mediante la utilización de un conector no nucleótido de diversas longitudes.

El conector no nucleósido puede ser, por ejemplo, alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un carbohidrato, un lípido, un ácido graso, tri-, tetra-, penta-, hexa- o poli-poli-etilenglicol (HEG) o una fracción heterocíclica. El polietilenglicol en particular es un hexaetilenglicol. Otros conectores no nucleósidos convencionales utilizan agentes entrecruzantes homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos homobifuncionales portan dos grupos funcionales idénticos, mientras que los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes para unir los compuestos biológicos al bioadhesivo. Una amplia mayoría de los agentes entrecruzantes heterobifuncionales contienen un grupo reactivo con amina primaria y un grupo reactivo con tiol. Los agentes entrecruzantes covalentes se seleccionan de entre los reactivos capaces de formar puentes disulfuro (S--S), glicol (--CH(OH)--CH(OH)--), azo (-N=N--), sulfona (--S(=O₂--), éster (--C(=O)--O--), o amida (--C(=O)--N--).

La sonda utilizada según la presente invención esta diseñada para presentar diferentes combinaciones del dominio de ácidos nucleicos de anclaje, el dominio de ácidos nucleicos informador y el conector no nucleósido. En algunas realizaciones, el conector puede unirse al extremo del dominio de ácidos nucleicos de anclaje o del dominio de ácidos nucleicos informador, por ejemplo en posición 3' o 5' del dominio de ácidos nucleicos de anclaje o el dominio de ácidos nucleicos informador. Alternativamente, el conector puede unirse a otras posiciones internas de uno o ambos dominios de ácidos nucleicos de la sonda, con la condición de que el enlace o la unión no interfiera con las funciones de la sonda, por ejemplo la hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana deseado. Por ejemplo, el conector puede unirse al dominio informador a, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más nucleótidos del extremo 3' o 5' del

dominio informador. De manera similar, el conector puede unirse al dominio de anclaje a, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más nucleótidos del extremo 3' o 5' del dominio de anclaje. El dominio de ácidos nucleicos de anclaje o el dominio de ácidos nucleicos informador pueden unirse en diversas posiciones del conector no nucleósido. En algunas realizaciones, dichos dominios de ácidos nucleicos se unen al extremo del conector. Opcionalmente pueden unirse a diferentes posiciones del conector.

III. Marcajes

En algunas realizaciones, el dominio de anclaje, el dominio informador o el conector no nucleótido se marcan detectablemente y, de esta manera, resultan de uso adicional en la detección de la secuencia diana. Tal como se ha indicado anteriormente, según la invención, el marcaje se une a la sonda de manera que resulta detectable la hibridación del dominio informador (no del dominio de anclaje). De esta manera, según la invención, el dominio de anclaje no se une a un marcaje mientras que el dominio informador generalmente se une a uno o más marcajes. Además, el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras. En algunas realizaciones, la sonda detectablemente marcada se utiliza para detectar y cuantificar la secuencia diana en una reacción de amplificación, por ejemplo en una reacción de amplificación en tiempo real.

Se conoce una amplia diversidad de marcajes detectables. Entre los marcajes ejemplares se incluyen marcajes fluorescentes (incluyendo, por ejemplo inhibidores o absorbedores), marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes bioluminiscentes, marcajes radioactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo peroxidasa, fosfatasa, etc.) y similares. Los marcajes pueden proporcionar señales detectables mediante fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo, actividad enzimática y similares. Pueden utilizarse marcajes para proporcionar una señal detectable (y opcionalmente cuantificable) y que puede unirse a un ácido nucleico o proteína.

En determinadas realizaciones de la invención, un marcaje es un pigmento fluorescente o fluoróforo. Típicamente, un fluoróforo particular puede emitir luz de una longitud de onda particular tras absorber luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de la luz emitida por un fluoróforo particular es característica de dicho fluoróforo. De esta manera, puede detectarse un fluoróforo particular mediante la detección de luz de una longitud de onda apropiada tras la excitación del fluoróforo con luz de longitud de onda más corta. Entre los marcajes fluorescentes pueden incluirse pigmentos con carga negativa, tales como pigmentos de la familia de la fluoresceína, o pigmentos de carga neutra, tales como pigmentos de la familia de la carboxirrodamina, o pigmentos con carga positiva, tales como los pigmentos de la familia de la cianina o de la familia de la rodamina. Entre otras familias de pigmentos que pueden utilizarse en la invención se incluyen, por ejemplo, pigmentos de la familia de la polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina, pigmentos de familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuaraina, pigmentos de la familia de lantánidos quelados, pigmentos ALEXA FLUOR® y pigmentos de la familia BODIPY®. Entre los pigmentos de la familia de la fluoresceína se incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Entre los pigmentos de la familia de la carboxirrodamina se incluyen rojo Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G y TAMRA son comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, Calif.) mientras que el rojo Texas es comercializado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.). Entre los pigmentos de la familia de la cianina se incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7 son comercializados por Amersham GE Healthcare (Piscataway, N.J.). Entre los inhibidores no fluorescentes se incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), comercializados por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Cal.), Iowa Black™, comercializados por Integrated DNA Tech., Inc. (Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), comercializados por Berry & Assoc. (Dexter, Mich.).

Pueden utilizarse en la presente invención diversas realizaciones de sistemas de señalización utilizando un marcaje. Puede unirse un marcaje (por ejemplo un fluoróforo, un inhibidor, un pigmento intercalante, una fluoresceína) al dominio de anclaje, el dominio informador o el conector no nucleósido. Puede utilizarse cualquier conformación de uno o más marcajes, con la condición de que resulte posible detectar una diferencia de señal dependiendo de la hibridación del informador con la secuencia diana ligante del informador. Entre los ejemplos de los sistemas de señalización de la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, las realizaciones siguientes.

55 Realización 1

En algunas realizaciones, el dominio informador o el dominio de anclaje se une a un pigmento intercalante que es capaz de ser incorporado entre las bases de una molécula de ácidos nucleicos de doble cadena y que produce una señal al intercalado. Entre los fluoróforos adecuados se incluyen, aunque sin limitación, los pigmentos de cianina (por ejemplo los desarrollados por Molecular Probes) (ver, por ejemplo, Eriksson et al., Nucleic Acids Research 31(21):6235-6242, 2003), bromuro de etidio, Picogreen, verde SYBR, acridina y otros.

En el caso de que el dominio informador se hibride con la secuencia diana de ácidos nucleicos (correspondiente), el dominio informador y la secuencia diana forman un dúplex y el pigmento unido pueden intercalarse dentro del dúplex, generando de esta manera una señal detectable. Por ejemplo, en el caso de que el dominio informador sea 100% complementario a un alelo del PNU o una mutación en una secuencia de ácidos nucleicos humana, bajo

condiciones adecuadas, el dominio informador se hibrida con el ácido nucleico diana y el pigmento intercalante unido al informador presenta una fluorescencia modificada o incrementada al resultar intercalado. En el caso de que el dominio informador no sea 100% complementario respecto al ácido nucleico diana, no se forma un dúplex, y el pigmento presenta un nivel de fluorescencia diferente (por ejemplo inferior).

Según la presente invención, en el caso de que se utilice un pigmento intercalante, la sonda se diseña de manera que se minimice cualquier pliegue interno dentro de la sonda. Lo anterior sirve para garantizar la ausencia de un dúplex formado entre el dominio de anclaje y el dominio informador y para ayudar a reducir cualquier ruido de fondo.

Realización 2

En algunas realizaciones, la sonda se une con un pigmento fluorescente y un pigmento inhibidor, en el que un pigmento se une al dominio informador y un pigmento se une al dominio de anclaje. En el caso de que el dominio informador no se hibride con la secuencia diana de ácidos nucleicos (por ejemplo una no correspondencia), la sonda asume una conformación en la que el pigmento fluorescente y el pigmento inhibidor se sitúan en estrecha proximidad, permitiendo que el inhibidor inhiba la señal procedente del pigmento fluorescente. En el caso de que el dominio informador se hibride con la secuencia "de unión a informador" (por ejemplo una correspondencia totalmente complementaria entre el dominio informador y la diana), el pigmento fluorescente se separa del inhibidor, permitiendo que la sonda emita fluorescencia. La inhibición de la fluorescencia puede conseguirse, aunque no necesariamente, con una estructura de tallo-bucle formada entre el dominio de anclaje y el dominio informador. Sin embargo, la inhibición puede conseguirse sin una estructura de tallo-bucle. Por ejemplo, la inhibición puede conseguirse al aproximar al azar el arrollado aleatorio de la sonda la pareja de pigmento fluorescente-pigmento inhibidor. Entre los ejemplos de un pigmento fluorescente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, FAM, TAMRA, TET y ROX. Entre los ejemplos de un pigmento inhibidor se incluyen, aunque sin limitación, DABCYL. Según la presente invención, el inhibidor puede ser un inhibidor fluorescente o un inhibidor no fluorescente. Entre los ejemplos de un inhibidor no fluorescente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, BHQ, Blackberry Quencher y negro Iowa.

Tal como se muestra en la figura 2, en algunas realizaciones, se une un pigmento fluorescente al extremo 5' del dominio informador y se une un pigmento inhibidor al extremo 5' del dominio de anclaje. En algunas realizaciones, se une un pigmento fluorescente al extremo 3' del dominio informador y se une un pigmento inhibidor al extremo 3' del dominio de anclaje. En una alternativa en la que el dominio de anclaje se encuentra en el extremo 5' de la sonda y el dominio informador se encuentra en el extremo 3' de la sonda, el pigmento fluorescente se encuentra en el extremo 3' del dominio informador y el inhibidor se encuentra en el extremo 3' del dominio de anclaje, o el pigmento fluorescente se encuentra en el extremo 5' del dominio informador y el inhibidor se encuentra en el extremo 5' del dominio de anclaje. En el caso de que el informador no se hibride con la secuencia "de unión a informador", el pigmento fluorescente queda próximo al pigmento inhibidor y la fluorescencia resulta inhibida. En el caso de que el informador se hibride con la secuencia "de unión a informador", el pigmento fluorescente es alejado del espacio próximo al pigmento inhibidor y, por lo tanto, la fluorescencia ya resulta inhibida.

En algunas realizaciones de la invención, el dominio informador en todos los casos se marca con un pigmento, sea el pigmento fluorescente o el pigmento inhibidor. El otro pigmento de la pareja inhibidora de fluorescencia puede unirse al dominio de anclaje o al conector no nucleósido.

Los pigmentos de dicha realización también pueden ser una pareja de transferencia de energía (por ejemplo "FRET") u otra pareja en la que la señal cambia como función de la proximidad. En el caso de que se utilice una pareja de pigmentos de transferencia de energía, ambos pigmentos son fluorescentes, el primero es un fluoróforo donante y el segundo es un fluoróforo aceptor. En el caso de que el donante y el aceptor se lleven a encontrarse en estrecha proximidad, se produce una transferencia de energía entre el donante y el aceptor, que emite una señal de una longitud de onda diferente. Puede detectarse la reducción de fluorescencia del donante o el incremento de fluorescencia del aceptor.

Realización 3

En algunas realizaciones, el dominio informador de la sonda se marca con un pigmento fluorescente y un pigmento inhibidor. En algunas de dichas realizaciones, el pigmento fluorescente y el pigmento inhibidor están diseñados para encontrarse en estrecha proximidad. Al irradiarlos, el pigmento fluorescente excitado transfiere energía a la molécula de pigmento inhibidor próxima en lugar de emitir fluorescencia. La estrecha proximidad respecto a la pareja de pigmento fluorescente-inhibidor evita la emisión de ninguna fluorescencia mientras se encuentre intacta la sonda.

La sonda está diseñada para hibridarse con un ácido nucleico diana. En el caso de que la polimerasa replique un molde al que se encuentra unido la sonda, la actividad de exonucleasa 5'-3' de la misma corta el extremo 5' de la sonda que contiene un pigmento fluorescente o un pigmento inhibidor. Lo anterior separa el pigmento fluorescente del pigmento inhibidor, es decir, el fragmento de ácidos nucleicos portador del pigmento fluorescente resulta liberado a la solución y ya no se encuentra en estrecha proximidad al pigmento inhibidor. Ello anula la actividad del inhibidor de manera que el pigmento fluorescente empieza a emitir fluorescencia.

En el caso de que exista un desapareamiento, el dominio informador de la sonda no se hibrida con la secuencia "de unión a informador" de los ácidos nucleicos diana. En este caso, la actividad de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa no corta el extremo 5' de la sonda. En consecuencia, la sonda permanece intacta, el pigmento fluorescente permanece en estrecha proximidad al pigmento inhibidor.

En la figura 3, se encuentra presente un pigmento fluorescente al extremo 5' del dominio informador y se une un pigmento inhibidor al extremo 3' del dominio informador. Un experto en la materia reconocerá que el pigmento inhibidor puede unirse a cualquier localización conveniente de la sonda, tal como al conector no nucleósido, o al dominio de anclaje, con la condición de que se mantenga el pigmento inhibidor en estrecha proximidad al pigmento fluorescente antes de la hibridación con la diana.

En algunas realizaciones, el pigmento inhibidor no necesita unirse covalentemente a la sonda. En algunos casos, el dominio informador se une a un informador fluorescente y se utiliza en una mezcla que comprende un inhibidor soluble (no unido a la sonda). El informador genera una señal en el caso de que el dominio informador no se encuentre unido a la diana. Al unirse el informador a una diana, el inhibidor intercalante se aproxima al informador y se reduce la señal. Por lo tanto, la reducción de la señal es un indicador de unión. Dicho aspecto se ilustra en, por ejemplo, la figura 4. Entre los inhibidores solubles ejemplares se incluyen, por ejemplo nuevo azul de metileno.

IV. Métodos

La presente invención se refiere a métodos de detectar secuencias diana de ácidos nucleicos en una muestra biológica utilizando las sondas tal como se indican en las reivindicaciones. Los métodos de la invención pueden utilizarse para detectar una secuencia diana de ácidos nucleicos de diversas fuentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, una muestra de sangre, una muestra de heces, una muestra de orina, una muestra de tejido o una biopsia. Los ácidos nucleicos diana pueden ser un ácido nucleico humano, un ácido nucleico de mamífero, un ácido nucleico vegetal, un ácido nucleico animal, un ácido nucleico vírico, un ácido nucleico bacteriano u otros ácidos nucleicos microbianos.

Los métodos de la presente invención resultan útiles para detectar la presencia o la ausencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos exacta. La secuencia diana de ácidos nucleicos puede ser, por ejemplo, un sitio de una potencial inserción, una delección o una sustitución de nucleótido. El ácido nucleico diana puede ser el resultado de una delección de genoma o una reorganización génica rara. Entre los ejemplos de una secuencia diana de ácidos nucleicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una secuencia diana de ácidos nucleicos que comprende un polimorfismo de nucleótido único (PNU) o una mutación somática rara en un organismo, o una secuencia de ácidos ribonucleicos. En algunas realizaciones de la invención, los métodos de la invención se refieren a la detección de un ácido nucleico humano que comprende una PNU o una mutación, utilizando una sonda que comprende un dominio informador que es 100% complementario a un alelo de la PNU o la mutación. En algunas otras realizaciones, los métodos de la invención resultan útiles para realizar el seguimiento de la presencia o la ausencia de variantes víricas o bacterianas particulares en un animal (incluyendo, aunque sin limitación, un ser humano) o en el medio. Entre los ejemplos de dichos agentes infecciosos se incluyen, aunque sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC) y virus del papiloma humano (VPH).

Los métodos de la invención pueden utilizarse en diversas técnicas de detección de secuencias. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden utilizarse en métodos de detección de producto de PCR de punto final, tal como el genotipado. En algunas realizaciones, los métodos de la invención se utilizan en técnicas de PCR en tiempo real. Además, los métodos y sondas de la invención pueden utilizarse en el análisis de hibridación, por ejemplo el análisis de disociación, mediante la medición de la curva de fusión o de hibridación. En algunas realizaciones de la invención, la detección del ácido nucleico diana comprende medir la alteración de la fluorescencia generada por las sondas de la invención. En algunas realizaciones, se utiliza PCR asimétrica (en la que un cebador se encuentra en exceso respecto a un segundo cebador) para generar la cadena molde apropiada que es complementaria a la sonda de la invención.

En algunas realizaciones de la invención, la detección del ácido nucleico diana comprende medir la temperatura de fusión de un complejo formado entre el dominio informador y la secuencia "de unión a informador". La temperatura de fusión del dominio informador del dominio informador con una diana dependerá del grado de complementariedad del dominio informador con su diana. En el caso de que la diana sea totalmente complementaria, la temperatura de fusión será más alta que si existe uno o más desapareamientos entre el informador y la diana. En los casos en que se conozcan las alternativas de diana más probables (por ejemplo en los que pueden encontrarse presentes dos alelos diferentes de un PNU en la diana), puede diseñarse la secuencia del informador para optimizar la diferencia de temperatura de fusión entre las diferentes opciones. Por ejemplo, el dominio informador puede incluir una o más bases estabilizadoras de manera que la diferencia de temperatura de fusión entre dominio informador y posibles (por ejemplo probables) secuencias diana se acentúe. En algunos ejemplos, la diferencia de T_f del dominio informador puede ser de aproximadamente por lo menos 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C o 8°C. En algunas realizaciones de la invención, la diferencia de T_f del dominio informador es de aproximadamente 10°C o superior.

Para conseguir una mayor diferenciación de correspondencia y no correspondencia, la diferencia de T_f del dominio informador entre correspondencia y no correspondencia puede incrementarse adicionalmente mediante la sustitución de nucleótidos complementarios naturales por nucleótidos complementarios no naturales. En algunas realizaciones de la invención, el número y tipos de sustituciones de nucleótido no natural se seleccionan para conseguir no sólo una mayor diferenciación entre correspondencia y no correspondencia, sino también una mayor diferenciación entre diferentes tipos de no correspondencia. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos de utilización de un dominio informador que comprende nucleótidos no naturales para diferenciar entre no correspondencias en diferentes posiciones. En algunas realizaciones de la invención, el dominio informador presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos complementarios no naturales.

V. Mezclas de reacción

La presente invención se refiere además a mezclas de reacción incluidas en los métodos de la invención. Una mezcla de reacción ejemplar comprende, por ejemplo, un ácido nucleico de una muestra biológica (por ejemplo una secuencia diana de ácidos nucleicos que comprende una región de unión de anclaje y una región de unión a informador) y una sonda marcada detectablemente tal como se indica en las reivindicaciones. Para detectar la presencia o la ausencia del ácido nucleico diana, particularmente la presencia o la ausencia de la región de unión a informador, la sonda se diseña de manera que el dominio informador comprenda una secuencia complementaria a la región de unión a informador, y el dominio de anclaje comprende una secuencia complementaria a la región de unión a anclaje. Ninguno de los dominios de la sonda forma un tallo-bucle en ausencia de un ácido nucleico diana y la sonda no es extensible por una ADN polimerasa.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción utilizada según la presente invención puede ser una mezcla de reacción para la amplificación del ácido nucleico diana. De acuerdo con lo anterior, la mezcla de reacción comprende por lo menos uno o más de entre ácido nucleico diana, nucleósidos trifosfato (por ejemplo dATP, dTTP, dCTP, dGTP), una ADN polimerasa y/o un cebador oligonucleótido.

VI. Kits

La presente invención se refiere además a kits para la utilización en los métodos de la invención. Los kits de la invención pueden incluir una o más de las sondas de dos dominios de la invención tal como se indica en las reivindicaciones, opcionalmente en combinación (en el mismo recipiente o en un recipiente adicional) con otro u otros reactivos tal como se indica en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit se encuentra compartimentalizado para facilitar el uso y contiene por lo menos un recipiente que proporciona una sonda de la presente invención tal como se indica en la presente memoria. También puede incluirse uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualesquiera reactivos u otros elementos reconocidos por el experto en la materia para la utilización en procedimientos de extensión de cebador de acuerdo con los métodos indicados anteriormente, incluyendo reactivos para la utilización en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR y RT-PCR), procedimientos de secuenciación del ADN o procedimientos de marcaje del ADN. El kit puede comprender, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia diana. En algunas realizaciones, el kit incluye además un recipiente que proporciona un cebador de sentido 5' hibridable, bajo condiciones de extensión de cebador, a la secuencia diana y/o una pareja de cebadores que comprende, por ejemplo, un cebador de sentido 5' y un cebador antisentido 3' correspondiente. En algunas realizaciones, el kit incluye además un recipiente que proporciona un inhibidor intercalante soluble. En otras variaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan nucleótidos libres (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el kit incluye dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de los pigmentos de la familia de la fluoresceína o de la cianina. En todavía otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebador.

Los ejemplos, referencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

VII. Ejemplos

Se diseñó un experimento para someter a ensayo varios nuevos constructos de sonda denominados sondas "Cobra". Las sondas Cobra presenta una secuencia 5' (informadora) y una secuencia 3' (de anclaje) unidas entre sí mediante un conector hexaetilenglicol (HEG). Las sondas Cobra se diseñaron para hibridarse a una secuencia de molde en la que el extremo 5' (informador) de la sonda Cobra es sustancialmente complementario a una secuencia diana en el molde. La secuencia diana puede variar potencialmente, dependiendo del molde que se encuentre presente. El área de variabilidad potencial se denomina "región variable". Dicho aspecto se comenta en mayor detalle posteriormente.

La secuencia 3' (de anclaje) de la sonda Cobra está diseñada para ser complementaria a una secuencia del molde

situada en el lado 5' (en el molde) respecto a la secuencia diana. Según el diseño, la secuencia del anclaje de la sonda Cobra es totalmente complementaria a cualquiera de los moldes utilizados en el experimento.

5 Cada sonda Cobra está marcada en el extremo de su informador (en el presente caso, 5') con fluoresceína. El inhibidor está representado por nuevo azul de metileno, un inhibidor soluble añadido a la mezcla de reacción.

Se generaron diversas versiones de la sonda Cobra con o sin bases estabilizadoras, de la manera siguiente:

10 5NS-CBRA-USRV no contenía bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases;

6ST-CBRA-USRV contenía 7 bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases y

15 7ST-CBRA-USRV contenía 7 bases estabilizadoras en la región informadora de 9 bases pero ninguna base estabilizadora en el centro de la región informadora correspondiente a la región variable en el molde.

Se utilizó una PCR asimétrica para amplificar el ADN molde a partir de uno de entre varios moldes, de la manera siguiente:

20 pK61WT - que presenta el molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 (segunda línea), incluyendo AAC subrayado, con una secuencia correspondiente (complementaria) al dominio informador de la sonda.

pK61C3 - que presenta molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 pero en el que las bases subrayadas son cAC, secuencia desapareada con el dominio informador de la sonda.

25 pK61T3 - que presenta molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 pero en el que las bases subrayadas son tAC, secuencia desapareada con el dominio informador de la sonda.

30 pK61G2 - que presenta molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 pero en el que las bases subrayadas son AgC, secuencia desapareada con el dominio informador de la sonda.

pK61T1 - que presenta molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 pero en el que las bases subrayadas son AAt, secuencia desapareada con el dominio informador de la sonda.

35 pK61A1 - que presenta molde para generar un amplicón mostrado en la figura 5 pero en el que las bases subrayadas son AAa, secuencia desapareada con el dominio informador de la sonda.

40 Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en presencia de 21 µM de nuevo azul de metileno y las sondas Cobra. Las temperaturas de fusión de los híbridos de informador/amplicón resultantes se determinaron utilizando el cambio de fluorescencia (el nuevo azul de metileno inhibe la fluoresceína de la sonda Cobra pero sólo en el caso de que la parte sonda de la sonda Cobra se encuentre hibridada con el molde). Se muestran los resultados en las tablas, a continuación.

Tabla Datos de Tf para las 3 sondas COBRA vs. amplicones de tipo salvaje y mutantes en el análisis de curvas de fusión post-PCR

T _f promedio	pKWT	pK61C3	pK61T3	pK61G2	pK61G1	pK61T1	pK61A1	Blanco
5NS-CBRA-USRV*	46,7	47,7	50,7	49,7	48,7	49,1	48,5	48,8
5NS-CBRA-USRV [§]	61,5	47,7	50,7	49,7	48,7	49,1	48,5	48,8
6ST-CBRA-USRV	69,0	66,1	66,3	66,7	66,1	66,3	66,3	59,7
7ST-CBRA-USRV	68,1	65,9	65,9	66,3	60,7	60,8	60,7	58,0
*5NS-CBRA-USRV presenta dos picos, el pico más bajo (primero) fue el utilizado para estos cálculos								
§ El segundo pico, más alto, se utilizó para estos cálculos								

45

T _f Desv. est.	pKWT	pK61C3	pK61T3	pK61G2	pK61G1	pK61T1	pK61A1	Blanco
5NS-CBRA-USRV*	0,2	0,7	0,2	1,0	0,0	0,0	0,2	0,2
6ST-CBRA-USRV	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,5
7ST-CBRA-USRV	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5

Diferencia de T _f mutante vs tipo salvaje	pKWT	pK61C3	pK61T3	pK61G2	pK61G1	pK61T1	pK61A1	Blanco
5NS-CBRA-USRV*	-	1,0	4,0	3,0	2,0	2,4	1,9	2,1
5NS-CBRA-USRV [§]	-	-13,5	-10,8	-11,8	-12,8	-12,4	-13,0	-12,7

ES 2 608 455 T3

6ST-CBRA-USRV	-	-2,9	-2,7	-2,3	-2,9	-2,7	-2,7	-9,3
7ST-CBRA-USRV	-	-2,3	-2,3	-1,9	-7,4	-7,3	-7,4	-10,2
*SNS-CBRA-USRV presenta dos picos, el más bajo (primero) se utilizó para estos cálculos §el segundo pico, más alto, se utilizó para estos cálculos								

- 5 Para el presente experimento los mejores resultados obtenidos fueron los de la sonda Cobra (7ST), que comprende bases estabilizadoras en la región informadora, pero ninguna base estabilizadora que se hibride con la región potencialmente variable de la secuencia diana. Dicha sonda permitió distinguir el "tipo salvaje" de los mutantes y también permitió distinguir entre los mutantes.
- La sonda 6ST (que presenta 7 bases estabilizadoras en la región informadora, incluyendo bases estabilizadoras en la región variable) fue capaz de distinguir entre "tipo salvaje" y "mutante", pero no pudo distinguir entre mutantes.
- 10 La sonda 5NS (sin bases estabilizadoras) no pudo distinguir entre tipo salvaje y mutante en el presente experimento.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de la presencia o de la ausencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos diana en una muestra biológica, comprendiendo el método:
- 5 a. poner en contacto una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador con la muestra, y
b. detectar la presencia o la ausencia de unión de la sonda al ácido nucleico diana,
- 10 en el que los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior a 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido y ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y en el que
- 15 (i) la sonda no es extensible por una polimerasa,
(ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras, de manera que la diferencia en la temperatura de fusión entre el dominio informador y las posibles secuencias diana se acentúa,
20 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y
(iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de detección comprende medir la temperatura de fusión de un complejo formado entre el dominio informador y el ácido nucleico diana.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el marcaje es un marcaje fluorescente y que comprende además poner en contacto la sonda y la muestra con un inhibidor intercalante soluble de manera que el inhibidor altera la fluorescencia del marcaje al formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.
- 30 4. Método según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano que comprende un polimorfismo de nucleótido único (PNU) y el dominio informador es complementario 100% respecto a un alelo del PNU.
- 35 5. Método según la reivindicación 1, en el que la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador en comparación con un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.
- 40 6. Método según la reivindicación 1, en el que el conector es polietilenglicol.
7. Mezcla de reacción para la detección de la presencia o de la ausencia de una secuencia diana, que comprende:
- 45 a. un ácido nucleico diana que comprende una región de unión a anclaje y una región de unión a informador, y
b. una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador,
- 50 en el que los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior a 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido y ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y en el que:
- 55 (i) la sonda no es extensible por una polimerasa,
(ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras, de manera que la diferencia en la temperatura de fusión entre el dominio informador y las posibles secuencias diana se acentúa,
60 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y
(iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana.
- 65 8. Mezcla de reacción según la reivindicación 7, en la que el marcaje es un marcaje fluorescente y que comprende además un inhibidor intercalante soluble, en el que el inhibidor altera la fluorescencia del marcaje al

formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.

- 5 9. Mezcla de reacción según la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano que comprende un polimorfismo de nucleótido único (PNU) y el dominio informador es complementario 100% respecto a un alelo del PNU.
10. Mezcla de reacción según la reivindicación 9, en la que el conector es polietilenglicol.
- 10 11. Kit para la detección de la presencia o de la ausencia de una secuencia diana, comprendiendo el kit:
- 15 a. una sonda marcada detectablemente que comprende un dominio de ácidos nucleicos de anclaje y un dominio de ácidos nucleicos informador, en la que:
- los dominios de anclaje e informador presentan una complementariedad inferior al 50% y están unidos mediante un conector no nucleósido,
- ni el dominio de anclaje ni el dominio informador forman una estructura de tallo-bucle en ausencia del ácido nucleico diana, y en la que:
- 20 (i) la sonda no es extensible por una polimerasa,
- (ii) el conector está unido al dominio de anclaje a 2 o menos nucleótidos del extremo 3' del dominio de anclaje y el conector está unido al dominio informador a 2 o menos nucleótidos del extremo 5' del dominio informador, en el que el dominio de anclaje no está unido a un marcaje detectable y el dominio informador comprende una o más bases estabilizadoras, de manera que la diferencia en la temperatura de fusión entre el dominio informador y las posibles secuencias diana se acentúa,
- 25 (iii) el dominio de anclaje y el dominio informado comprenden, cada uno, una secuencia contigua de por lo menos 6 nucleótidos complementarios a la misma cadena del ácido nucleico diana, y
- (iv) en el que la hibridación entre el dominio de anclaje y el ácido nucleico diana por sí mismo resulta suficiente para regular la hibridación de la sonda en la localización deseada del ácido nucleico diana,
- 30 y
- b. uno o más reactivos seleccionados de entre el grupo que consiste de una sal, un tampón, un inhibidor de nucleasa, nucleósidos trifosfato, una ADN polimerasa y/o un cebador oligonucleótido.
- 35 12. Kit según la reivindicación 11, en el que el kit comprende además un inhibidor intercalante soluble de manera que el inhibidor altera la fluorescencia procedente del marcaje al formar el dominio informador un complejo con el ácido nucleico diana.
- 40 13. Kit según la reivindicación 11, en el que la sonda comprende por lo menos un nucleótido no natural, en el que el nucleótido no natural incrementa la temperatura de fusión del dominio informador en comparación con un nucleótido natural correspondiente en el lugar del nucleótido no natural.

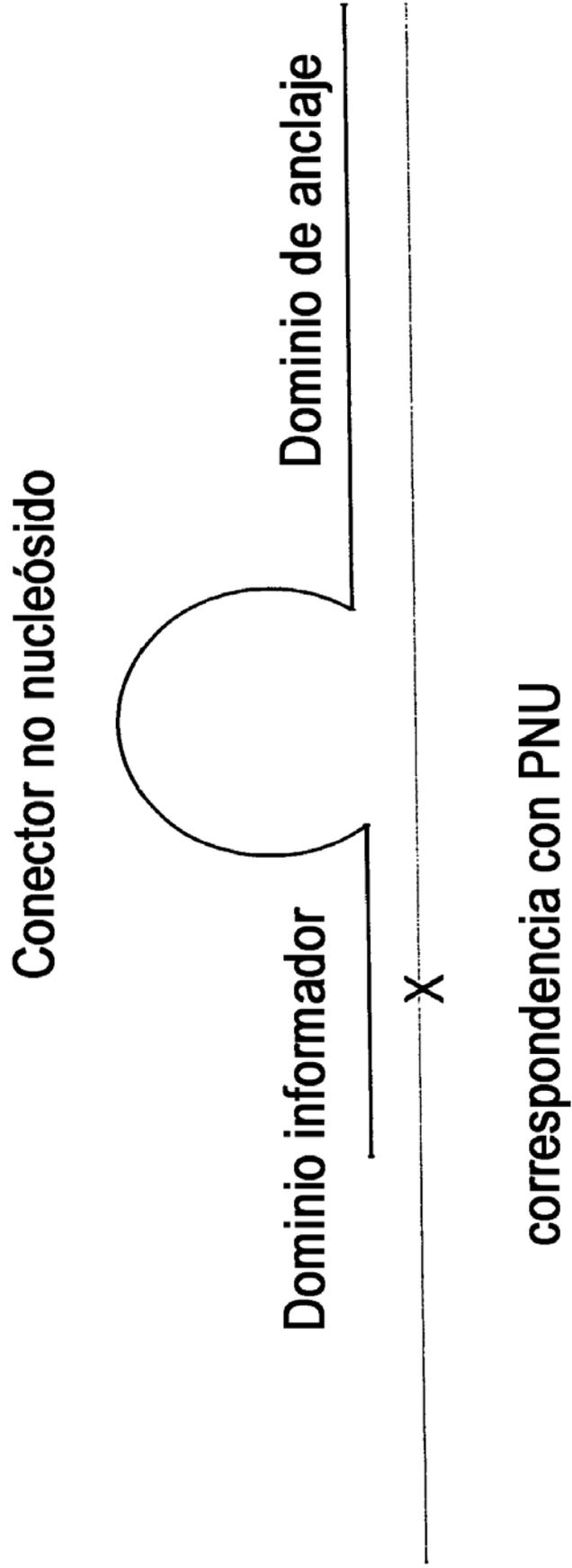
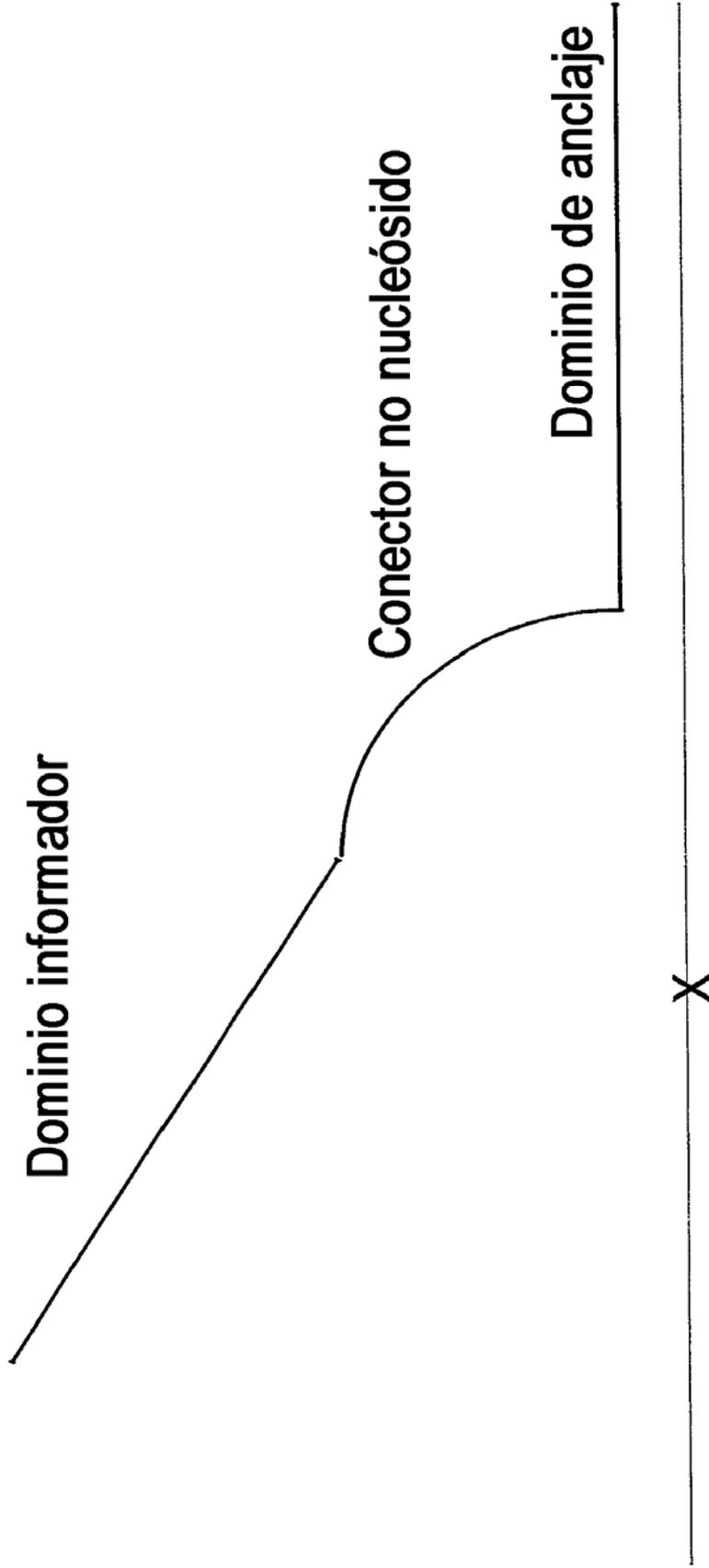


FIG. 1A



No correspondencia de PNU

FIG. 1B

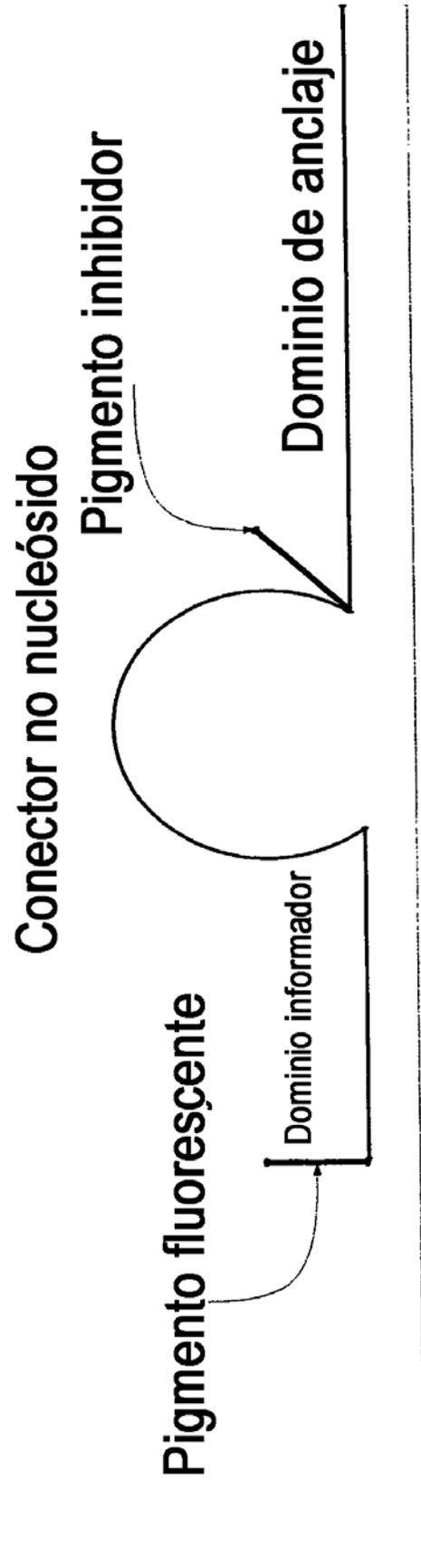


FIG. 2

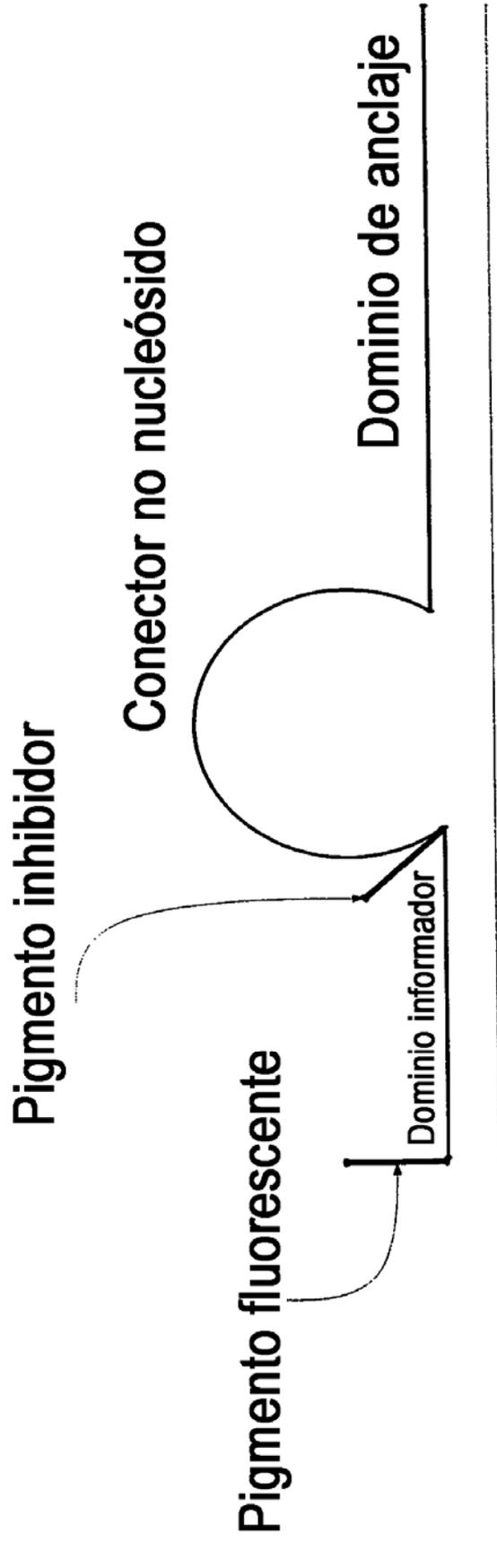


FIG. 3

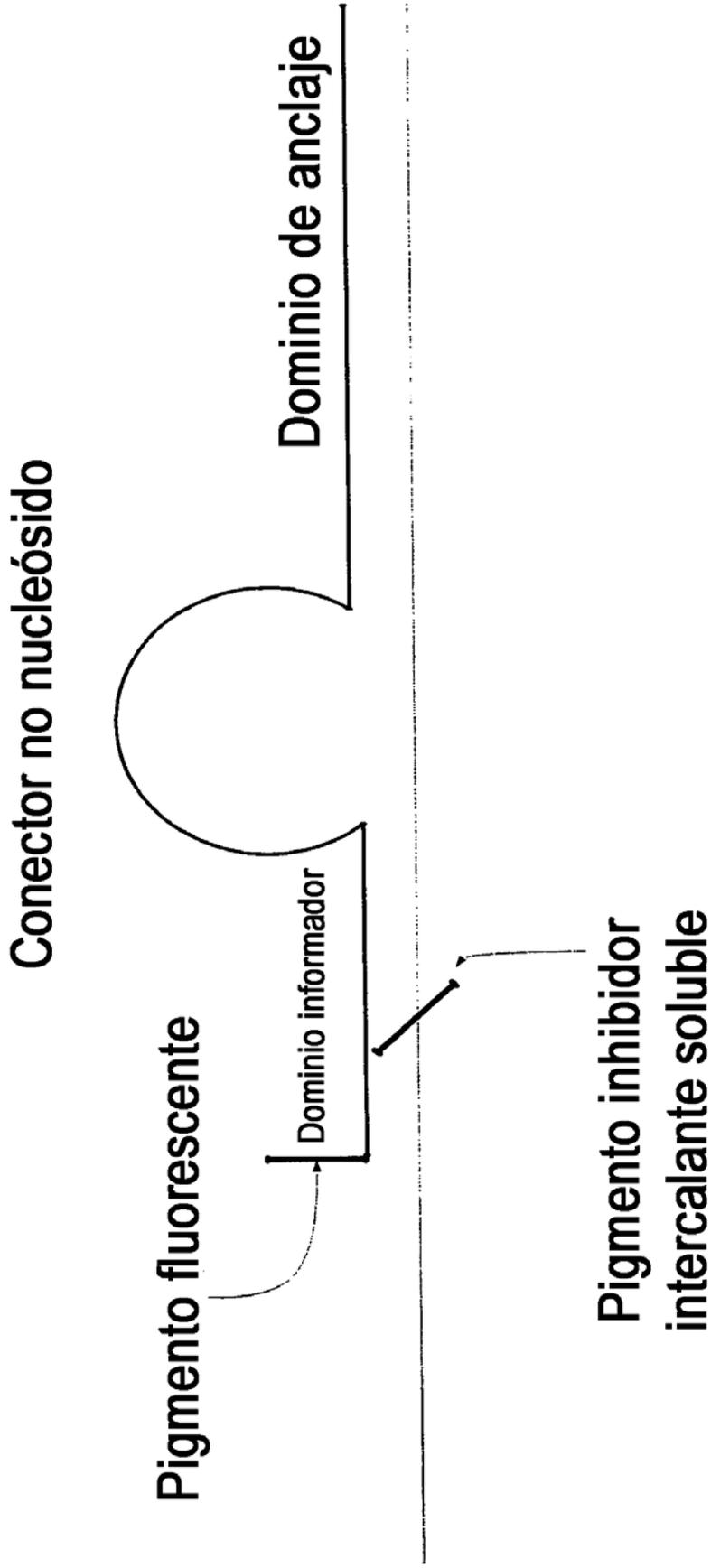


FIG. 4

FIGURA 5

Diseño de sonda COBRA

5NS-CBRA_USRV	5' <u>FCTCTTGACC</u> B	<u>TGTGTCGAGAAATA</u> <u>TCCAAGAGACA</u> <u>GGTTTCTP</u> 3'	*	(SEC ID n°1)
6WT-X3-UF-CMP	3' - CATGA GGAGAACTGGAC	GACACAGCTCTTATAGGTTCTCTGTCCAAAGAGGTAGT-5'	**	(SEC ID n°2)
6ST-CBRA_USRV	5' <u>FLJLJJGALL</u> B	<u>TGTGTCGAGAAATA</u> <u>TCCAAGAGACA</u> <u>GGTTTCTP</u> 3'	***	(SEC ID n°1)
7ST-CBRA_USRV	5' <u>FLJLTTGALL</u> B	<u>TGTGTCGAGAAATA</u> <u>TCCAAGAGACA</u> <u>GGTTTCTP</u> 3'	****	(SEC ID n°1)

Leyenda Denom. oligo
 E = conector HEG = E
 PU = propinil-dU = J
 PC = propinil-dC = L
 F = Fluoresceína = F
 PO4 = Fosfato = P

- * Sonda COBRA exón-3 no estabilizada, orientación de complemento inverso cadena arriba, 5'-FAM
- ** Cadena del complemento directo cadena arriba
- *** Sonda COBRA exón-3 estabilizada, orientación de complemento inverso cadena arriba, 5'-FAM
- **** Sonda COBRA exón-3 estabilizada, orientación de complemento inverso cadena arriba, 5'-FAM