

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 263**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/EP2013/077016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO2014095952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13808024 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2935306**

54 Título: **Sondas oligonucleotídicas marcadas usadas para análisis de secuencias de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:
20.12.2012 US 201261740297 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2017

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**ANACLETO, CONCORDIO;
BUGAWAN, TEODORICA y
SCHOENBRUNNER, NANCY**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 613 263 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

Sondas oligonucleotídicas marcadas usadas para análisis de secuencias de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para la detección y análisis de secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de oligonucleótidos marcados con fluorescencia. La invención tiene aplicaciones para formación de genotipos, detección de patógenos y diagnóstico *in vitro*.

10

Antecedentes de la invención

El desarrollo de tecnología de amplificación de ácido nucleico ha revolucionado el análisis genético y la ciencia de la ingeniería. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza comúnmente para amplificar ácidos nucleicos diana específicos usando ácidos nucleicos cebadores seleccionados, por ejemplo, para facilitar la detección del ácido nucleico diana como parte de una aplicación de diagnóstico, forense u otra aplicación. Por lo general, los cebadores funcionan en pares que están diseñados para la ampliación uno hacia el otro para cubrir la región diana seleccionada. Un ciclo de PCR habitual incluye una etapa de desnaturalización a alta temperatura (por ejemplo, 85 °C o más) durante la cual las hebras de ácido nucleico bicatenario se separan las unas de las otras, una etapa de hibridación a baja temperatura (por ejemplo, 45-65 °C) durante la cual los cebadores se hibridan con la hebra simple separada, y una etapa de extensión a temperatura intermedia (por ejemplo, aproximadamente 72 °C) durante la cual una ácido nucleico polimerasa amplía los cebadores. También se usan procedimientos de termociclado de dos temperaturas. Por lo general, estos incluyen una etapa de desnaturalización a alta temperatura y una etapa de ampliación de la hibridación a baja temperatura.

25

Se han desarrollado diversas estrategias para detectar productos de amplificación y uno de los métodos que más se utiliza en general es el ensayo de 5' nucleasa o TaqMan[®]. Por lo general, el ensayo de nucleasa utiliza la actividad de nucleasa de las posiciones 5' a 3' de ciertas ADN polimerasas para escindir las sondas oligonucleotídicas de nucleasa en la posición 5' durante el transcurso de la PCR. Este ensayo permite tanto la amplificación de una diana como la liberación de marcadores para detección, por lo general sin recurrir a múltiples etapas de manipulación de productos amplificados. Las sondas de nucleasa en la posición 5' por lo general contienen típicamente restos de marcado, tales como un colorante indicador fluorescente y un colorante inactivador. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador por lo general da como resultado la supresión de la fluorescencia del indicador. Durante una reacción de nucleasa en la posición 5', la escisión de la sonda separa el colorante indicador y el colorante inactivador entre sí, dando como resultado un aumento detectable de la fluorescencia del indicador. La acumulación de productos de PCR o amplicones se detecta por lo general de forma indirecta controlando este aumento de fluorescencia en tiempo real.

30

La tecnología TaqMan[®] también se puede usar para amplificación de ADN y detección de genotipos en un ensayo de una sola etapa. En este formato, se usan dos sondas oligonucleotídicas, una para cada alelo, que están diseñadas para hibridarse con una región del molde de ADN que contiene el nucleótido específico del alelo. Cada una de las sondas se marca con un colorante fluorescente diferente. Durante la etapa de amplificación de PCR, la sonda que está perfectamente emparejada con el molde se digiere, dando lugar a un aumento de la señal de fluorescencia a partir del colorante correspondiente. Sin embargo, la sonda que tiene una única falta de coincidencia de nucleótido no se puede hibridar de manera estable con el ADN molde, y no se puede degradar con la actividad de nucleasa. El colorante indicador correspondiente de la sonda de "con falta de coincidencia" aún podría estar desactivado por la molécula inactivadora y podría no presentar señal fluorescente. Con la disponibilidad de instrumentos de detección de fluorescencia más sofisticados, se puede realizar la formación de genotipos de múltiples genes o de múltiples posiciones alélicas de un gen en este tipo de ensayo usando múltiples sondas, cada una de ellas marcada con cada colorante indicador fluorescente único.

40

El documento WO 2009/038548 desvela oligonucleótidos que contienen un colorante indicador fluorescente marcado y una molécula inactivadora de fluorescencia y, por ejemplo, describe un proceso en el que un ácido nucleico está marcado con un colorante de rodamina en la posición 3'. El proceso desvelado comprende las etapas de proporcionar un colorante de rodamina, unir un enlazador al mismo y acoplar el colorante al oligonucleótido a través del enlazador. El nucleótido marcado se usa como una sonda para detectar un ácido nucleico diana en reacciones de amplificación. Sin embargo, los oligonucleótidos marcados apropiados tienen una estabilidad al almacenamiento poco adecuada que da como resultado una disminución enorme de las señales de fluorescencia en las curvas de crecimiento generadas por la sonda.

55

60 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para generar una sonda oligonucleotídica marcada que contiene un colorante obtenido a partir de rodamina fluorescente para su uso en reacciones de PCR para detectar un ácido nucleico diana. En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un oligonucleótido marcado para su uso como una sonda de hibridación en una reacción de PCR que comprende:

65

proporcionar un colorante fluorescente que es un derivado de rodamina en el que dicho colorante fluorescente está unido con una molécula enlazadora bifuncional; unir un grupo reactivo al colorante fluorescente a través de la molécula enlazadora bifuncional para incorporar dicho colorante fluorescente dentro del oligonucleótido;

- 5 incorporar el colorante fluorescente entre dos nucleótidos internos del oligonucleótido, con la condición de que el colorante fluorescente no se incorpore en el extremo 5' terminal del oligonucleótido, en el que la molécula enlazadora bifuncional consiste en L-treoninol o (2R,3R)-2-amino-1,3-butanodiol.

10 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana o un alelo diana de un ácido nucleico en una muestra de ensayo, que comprende:

15 realizar una reacción de PCR con el uso de un oligonucleótido sonda marcado que se hibrida con el ácido nucleico diana, en el que el oligonucleótido sonda marcado se caracteriza por que tiene: un colorante fluorescente que es un derivado de rodamina que se une con una molécula enlazadora bifuncional; y un grupo reactivo unido a la molécula enlazadora bifuncional para incorporar el colorante fluorescente entre dos nucleótidos internos del oligonucleótido, con la condición de que el colorante fluorescente no se incorpore en el extremo 5' terminal del oligonucleótido, en el que la molécula enlazadora bifuncional consiste en L-treoninol o (2R,3R)-2-amino-1,3-butanodiol; detectar la señal del colorante fluorescente en el que la intensidad de dicha señal representa la presencia o ausencia del ácido nucleico diana.

20 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las estructuras químicas de (A) núcleo del colorante rodamina y (B) L-treoninol.

25 La Figura 2 muestra la estructura química de JA270 (análogo de ácido carboxílico)

La Figura 3 muestra el patrón de elución de los oligonucleótidos en una columna de UPLC en el reactivo de referencia del colorante en la posición 5 (mezcla del colorante 5, mezcla 2 μ M) que se realizó por la mañana (parte superior) y por la tarde (parte inferior) del mismo día.

30 La Figura 4 muestra el análisis de UPLC del reactivo de referencia del colorante en la posición 5 que contiene el oligonucleótido de JA270 marcado interno usando detección de fluorescencia.

35 La Figura 5 muestra los oligonucleótidos presentes en la solución de "mezcla madre", tal como se analiza mediante UPLC.

La Figura 6 muestra los oligonucleótidos presentes en la misma solución de "mezcla madre" después de 3 días de almacenamiento a 4 °C, tal como se analiza mediante UPLC.

40 La Figura 7 muestra las curvas de crecimiento de PCR genera las usando la sonda R33 que se había almacenado durante 0 días, 3 semanas o 6 semanas con el molde de plásmido de control positivo (RR) o el molde de plásmido de control negativo (CC).

Descripción detallada de la invención

45 **Definiciones**

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado que normalmente entiende una persona con experiencia en la materia a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan a alguien con experiencia una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2^a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and

55 Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5^a Ed., R. Rieger *et al.*, (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique de otro modo.

60 El término "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, etc.) y comprende ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), híbridos de ADN-ARN, oligonucleótidos, polinucleótidos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), conjugados de PNA-ADN, conjugados de PNA-ARN, etc., que comprenden nucleótidos unidos de forma covalente entre sí, de una manera ya sea lineal o ramificada. Por lo general, un ácido nucleico es monocatenario o bicatenario y por lo general contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos están incluidos los análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, que incluyen por ejemplo fosforamida (Beaucage *et al.*, (1993) Tetrahedron 49 (10): 1925); fosforotioato (Mag *et al.*, (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437; y Pat. de Estados Unidos N.º 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, (1989) J. Am. Chem. Soc.

111: 2321), uniones de O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y las cadenas principales y uniones de de ácidos nucleicos peptídicos (véase, Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895). Otros análogos de ácido nucleico incluyen aquellos con cadenas principales con carga positiva (Denpcy *et al.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097); cadenas principales no iónicas (Pat. de Estados Unidos N.ºs 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las que se describen en las Pat. de Estados Unidos N.ºs 5.235.033 y 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins *et al.*, (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp. 169-176), y los análogos también se describen, por ejemplo, en Rawls, C y E News, 2 de Jun. de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato se pueden hacer para facilitar la adición de restos adicionales tales como marcadores, o para alterar la estabilidad y la semivida de tales moléculas en entornos fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas de origen natural, que por lo general se encuentran en los ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de nucleótido también pueden incluir bases heterocíclicas que no son de origen natural, tales como las que se describen, por ejemplo, en Seela *et al.*, (1999) *Helv. Chim. Acta* 82: 1640. Ciertas bases usadas en análogos de nucleótido actúan como modificadores de la temperatura de fusión (Tm). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.), y similares. Véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas 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-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, y similares.

Un "nucleósido" se refiere a un componente de ácido nucleico que comprende una base o grupo básico (que comprende al menos un anillo homocíclico, al menos un anillo heterocíclico, al menos un grupo arilo, y/o similares) unido de forma coherente a un resto de azúcar (un azúcar ribosa o un azúcar desoxirribosa), un derivado de un resto de azúcar, o equivalente funcional de un resto de azúcar (por ejemplo, un anillo carbocíclico). Por ejemplo, cuando un nucleósido incluye un resto de azúcar, por lo general la base está unida a una posición 1' de ese resto de azúcar. Como se ha descrito anteriormente, una base puede ser una base de origen natural o una base de origen no natural. Los nucleósidos a modo de ejemplo incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, didesoxirribonucleósidos y nucleósidos carbocíclicos.

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster fosfato de un nucleósido, que tiene uno, dos, tres o más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de un resto de azúcar del nucleósido.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente. "Oligonucleótido" es un término usado en ocasiones para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede estar formado por al menos 6 nucleótidos, por ejemplo al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15-30 nucleótidos que corresponden a una región de la secuencia de nucleótidos designada.

La expresión "tipo silvestre", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen o alelo que tiene las características de ese gen o alelo cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre o un alelo de tipo silvestre es el que se observa más frecuentemente en una población y de forma arbitraria se denomina forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen o alelo.

Por el contrario, el término "mutante" o "mutado" se refiere a un gen o alelo que presenta modificaciones en la secuencia cuando se compara con el gen o alelo de tipo silvestre. El término "mutación" se refiere a un cambio en la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico normalmente conservada que da como resultado la formación de un mutante tal como se diferencia a partir de la secuencia normal (no alterada) o de tipo silvestre. Por lo general, las mutaciones se pueden dividir en dos clases generales, es decir, sustituciones de pares de bases (por ejemplo, sustituciones de un solo nucleótido) y mutaciones de desplazamiento de marco. Las últimas implican la inserción o delección de uno a varios pares de nucleótidos.

El término "alelo" se refiere a dos secuencias que solo son diferentes en una base o en unas pocas bases.

Los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a hebras antiparalelas de polinucleótidos relacionadas mediante las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las expresiones "perfectamente complementarias" o "complementarias en un 100 %" se refieren a secuencias complementarias que tienen emparejamiento de Watson-Crick de todas las bases entre las hebras antiparalelas, es decir, no hay faltas de coincidencia entre cualquiera de dos bases en el dúplex del polinucleótido. Sin embargo, los dúplex se forman entre hebras antiparalelas incluso en ausencia de complementariedad perfecta. Las expresiones "parcialmente complementarias" o "complementarias de forma incompleta" se refieren a cualquier alineación de bases entre las hebras de polinucleótidos antiparalelas que es perfecta en menos de un 100 % (por ejemplo, existe al menos una

falta de coincidencia o base no emparejada en el dúplex de polinucleótidos). Por lo general, los dúplex entre hebras parcialmente complementarias son menos estables que los dúplex entre hebras perfectamente complementarias.

5 El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contenga o que se supone que contiene ácido nucleico. Esta incluye una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo, por ejemplo, piel, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, fluido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos y tumores, y también a muestras de cultivos *in vitro* establecidos a partir de células tomadas de un individuo, incluyendo tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (FFPET) y ácidos nucleicos aislados a partir de los mismos.

10 La expresión "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones del nucleótido tales como modificaciones en la base nitrogenada, modificaciones de azúcar u otras modificaciones de la cadena principal no son una parte de la secuencia primaria. Los marcadores, tales como cromóforos conjugados con los oligonucleótidos, tampoco son una parte de la secuencia primaria. Por lo tanto dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia primaria pero son diferentes con respecto a las
15 modificaciones y marcadores.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis junto con una hebra complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para tal síntesis. Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un
20 oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y que normalmente se puede marcar de manera detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación en el extremo 3' terminal que hace que la sonda no se pueda extender mediante ácido nucleico polimerasas, y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede servir como un cebador en un ensayo y como una sonda en un ensayo diferente.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula enlazadora bifuncional" se refiere a un compuesto que puede unir dos o más compuestos adicionales en conjunto mediante interacción de forma química con los mismos de manera simultánea. En la presente invención, por ejemplo, una molécula enlazadora bifuncional puede tener un dominio funcional que sea adecuado para el acoplamiento a un marcador, tal como un colorante
30 fluorescente y otro dominio funcional u otros dominios funcionales capaces de acoplarse en la posición en el extremo 5'-terminal, en la posición en el extremo 3' terminal o en una posición interna de un oligonucleótido. En la presente invención, la molécula enlazadora bifuncional podría comprender, por ejemplo, L-treoninol. En la Pat. de Estados Unidos N.º 5.585.481, Pat. de Estados Unidos N.º 6.130.323, Nelson *et al.*, Nucl. Acid. Res. 20: 6253-6259, 1992, documento WO 03/102239 y Ju *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92: 4347-4351, 1992, se han descrito diversas
35 moléculas enlazadoras bifuncionales capaces de unir un marcador en una posición interna de un oligonucleótido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a una porción de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a amplificar, detectar o ambos.

40 Los términos "hibridado" e "hibridación" se refieren a la interacción de emparejamiento de bases entre los ácidos nucleicos que da como resultado la formación de un dúplex. Para conseguir la hibridación no es un requisito que los ácidos nucleicos tengan una complementariedad de un 100 % con respecto a su longitud completa.

45 Las expresiones "hibridación selectiva" e "hibridación específica" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico predominantemente (50 % o más de la molécula de hibridación) casi exclusivamente (90 % o más de la molécula de hibridación) a un ácido nucleico en particular presente en una mezcla compleja en la que también están presentes otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, en condiciones de PCR habituales, los cebadores se hibridan de forma específica con los ácidos nucleicos diana con la exclusión de los ácidos nucleicos no diana o también presentes en la solución. Los cebadores hibridados de forma específica conducen en la amplificación del ácido nucleico diana para producir un producto de amplificación del ácido nucleico diana que es al menos el producto de amplificación más predominante que es preferentemente el producto de amplificación casi exclusivo (por ejemplo, que representa un 90 % o más de todos los productos de amplificación en la muestra). Preferentemente, el producto de amplificación no específico está presente en cantidades tan pequeñas que no se puede detectar o se detecta en cantidades tan pequeñas de modo que se puede distinguir fácilmente del producto de amplificación específico. De
50 forma análoga, las sondas se hibridan de forma específica con los ácidos nucleicos diana con la exclusión de los ácidos nucleicos no diana también presentes en la mezcla de reacción. Las sondas hibridadas en forma específica permiten la detección específica del ácido nucleico diana para generar una señal detectable que es al menos la señal más predominante y es preferentemente la señal casi exclusiva (por ejemplo, que representa un 90 % o más de todos los productos de amplificación en la muestra).

60 *Sondas Específicas de Alelo*

La hibridación específica de alelo se basa en distinguir entre dos moléculas de ADN que difieren en al menos una base por hibridación de un oligonucleótido que es específico para una de las secuencias variantes a un producto amplificado obtenido a partir de la amplificación de la muestra de ácido nucleico. Un ensayo específico de alelo
65 puede comprender también dos oligonucleótidos específicos de alelos, por ejemplo, una sonda específica de alelo

para la primera variante y una sonda específica de alelo para la segunda variante en la que las sondas se hibridan diferencialmente a una variante con respecto a la otra. La hibridación específica de alelo por lo general en oligonucleótidos cortos, por ejemplo, con una longitud de 15-35 nucleótidos. En la técnica hay disponibilidad de principios y directrices para diseñar dicha sonda. Las condiciones de hibridación deberían ser lo suficientemente rigurosas como para que existiera una diferencia significativa en la intensidad de hibridación entre alelos, y preferentemente una respuesta esencialmente binaria, por lo que una sonda se hibrida solamente con uno de los alelos. Algunas sondas se diseñan para su hibridación con un segmento de ADN diana de tal manera que el sitio de interés se alinea con una posición central de la sonda, pero este diseño no es necesario.

La cantidad y/o presencia de un alelo se determina midiendo la cantidad de sonda específica de alelo que se hibrida a la muestra. Por lo general, el oligonucleótido está marcado con un marcador, tal como un marcador fluorescente. Por ejemplo, se hibridiza una sonda específica de alelo que es específica para un alelo del ácido nucleico diana a ácidos nucleicos obtenidos a partir de una muestra biológica en condiciones de hibridación que dan como resultado una hibridación preferente con un alelo. La intensidad de la fluorescencia se mide para determinar si el oligonucleótido específico se ha hibridado.

El nucleótido presente en el sitio polimórfico de un solo nucleótido se identifica por hibridación en condiciones de hibridación suficientemente rigurosas con un oligonucleótido sustancialmente complementario al alelo en una región que abarca el sitio polimórfico y exactamente complementario con el alelo diana en este sitio. En tales condiciones de hibridación suficientemente rigurosas, los dúplex estables se formarán solamente entre la sonda y el alelo diana. Estos oligonucleótidos sonda pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos.

El uso de oligonucleótidos sustancialmente, en lugar de exactamente, complementarios puede ser deseable en formatos de ensayo en los que la optimización de las condiciones de hibridación es limitada. Por ejemplo, en un formato de ensayo de sonda inmovilizada de múltiples dianas, las sondas para cada diana se inmovilizan sobre un único soporte sólido. Las hibridaciones se realizan de forma simultánea poniendo en contacto el soporte sólido con una solución que contiene ADN diana. Como todas las hibridaciones se realizan en condiciones idénticas, las condiciones de hibridación no se pueden optimizar por separado para cada sonda. La incorporación de faltas de coincidencia en una sonda se puede usar para ajustar la estabilidad del dúplex cuando el formato de ensayo impide ajustar las condiciones de hibridación. El efecto de una falta de coincidencia introducida en particular en la estabilidad del dúplex se conoce bien, y la estabilidad del dúplex se puede calcular y determinar de forma empírica de forma rutinaria, como se ha descrito anteriormente. Las condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño y secuencia exactos de la sonda, se pueden seleccionar de forma empírica usando las directrices proporcionadas en el presente documento y bien conocidas en la técnica. El uso de sondas oligonucleotídicas para detectar diferencias de un solo par de bases en secuencia se describe, por ejemplo, en Conner *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 278-282, y en las Pat. de Estados Unidos N.ºs 5.468.613 y 5.604.099.

El cambio proporcional en la estabilidad entre un dúplex de hibridación perfectamente emparejado y con falta de coincidencias de una sola base depende de la longitud de los oligonucleótidos hibridados. Los dúplex formados con secuencias de sondas más cortas se desestabilizan proporcionalmente más por la presencia de una falta de coincidencia. En la práctica, para la detección específica de la secuencia se prefieren los oligonucleótidos con una longitud entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. Además, dado que los extremos de un oligonucleótido hibridado sufren una disociación aleatoria continua y una nueva hibridación debido a la energía térmica, una falta de coincidencia en cualquier extremo desestabiliza el dúplex de hibridación menos que una falta de coincidencia que se produzca e internamente. Preferentemente, para la discriminación de un único cambio de par de bases en la secuencia diana, se selecciona la secuencia sonda que se hibrida con la secuencia diana de modo que el sitio de mutación se produce en la región interior de la sonda.

50 *Ensayo de 5'-Nucleasa*

La detección de un ácido nucleico diana se puede realizar usando un ensayo "TaqMan®" o de "5'-nucleasa", como se describe en las Pat. De Estados Unidos N.ºs 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y en Holland *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280. En el ensayo TaqMan®, las sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada están presentes durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican para evitar que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se realiza usando una ADN polimerasa que tiene actividad de exonucleasa de las posiciones 5' a 3'. Durante cada etapa de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que se hibrida con el ácido nucleico diana cadena abajo del cebador que se está ampliando se degrada por la actividad de exonucleasa de las posiciones 5' a 3' de la ADN polimerasa. Por lo tanto, la síntesis de una nueva hebra de diana también da como resultado la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de las secuencias diana.

Cualquier método adecuado para detectar el producto de degradación se puede usar en un ensayo de 5' nucleasa. A menudo, la sonda de detección está marcada con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de inactivar la fluorescencia del otro colorante. Los colorantes se unen a la sonda, por lo general con el indicador o colorante detector unido al extremo en el extremo 5' terminal y la inactivación del colorante unido a un sitio interno,

de modo que la inactivación se produce cuando la sonda se encuentra en un estado no hibridado t y una escisión de este tipo de la sonda mediante la actividad de exonucleasa de las posiciones 5' a 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos colorantes. La amplificación da como resultado la escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación simultánea de la inactivación y un aumento de la fluorescencia observable a partir del colorante inactivado inicialmente. La acumulación del producto de degradación se controla midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción. Las Pat. de Estados Unidos N.ºs 5.491.063 y 5.571.673 describen métodos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce de manera simultánea con la amplificación.

Un ensayo de 5' nucleasa para la detección de un ácido nucleico diana puede emplear cualquier polimerasa que tenga una actividad exonucleasa de las posiciones 5' a 3'. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las polimerasas con actividad de 5'-nucleasa son polimerasas de ácido nucleico termoestables y termoactivas. Tales polimerasas termoestables incluyen, pero no se limitan a, formas nativas y recombinantes de polimerasas de una diversidad de especies de los géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga*, y *Thermosipho*, así como formas químicas de los mismos. Por ejemplo, las polimerasas de las especies *Thermus* que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (*Tth*), ADN polimerasa de la especie Z05 de *Thermus* (Z05), especie sps17 de *Thermus* (sps17), y especie Z05 de *Thermus* (por ejemplo, como se describe en las Pat. de Estados Unidos N.ºs 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 5.618.711, 5.674.738 y 5.795.762). Las polimerasas de *Thermatoga* que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa de *Thermatoga maritima* y ADN polimerasa de *Thermatoga neapolitana*, mientras que un ejemplo de una polimerasa de a *Thermosipho* que se puede usar es la ADN polimerasa de *Thermosipho africanus*. Las secuencias de ADN polimerasas de *Thermatoga maritima* y *Thermosipho africanus* están publicadas en la solicitud internacional WO 92/06200. La secuencia de *Thermatoga neapolitana* se puede encontrar en la solicitud internacional WO 97/09451.

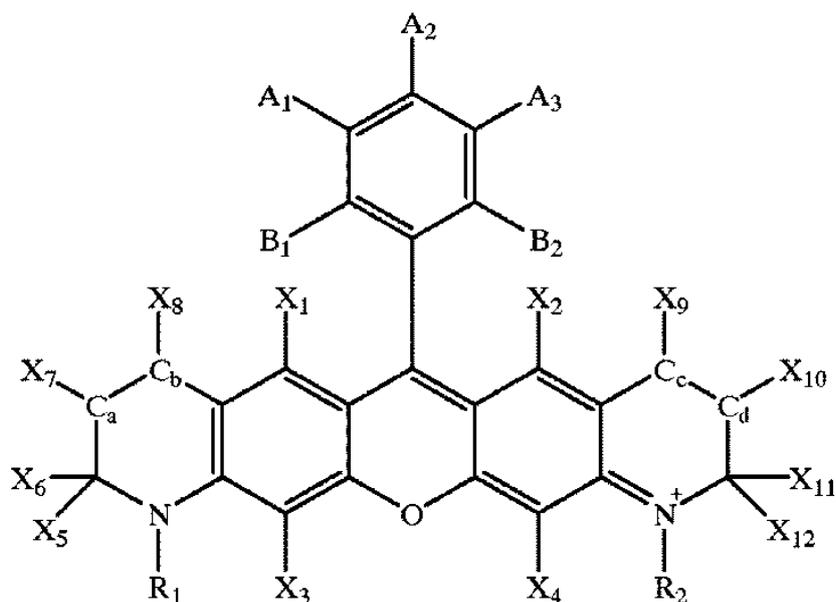
En el ensayo de nucleasa en la posición 5', la detección de amplificación es, por lo general, simultánea a la amplificación (es decir, en "tiempo real"). En algunas realizaciones la detección de amplificación es cuantitativa, y la detección de amplificación es en tiempo real. En algunas realizaciones, la detección de amplificación es cualitativa (por ejemplo, detección de punto final de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana). En algunas realizaciones, la detección de amplificación es posterior a la amplificación. En algunas realizaciones, la detección de amplificación es cualitativa y la detección de amplificación es posterior a la amplificación.

La sonda se puede marcar con cualquier número de marcadores, pero por lo general es un marcador fluorescente. En algunas realizaciones, el resto fluoróforo se selecciona entre colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuaraina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados, colorantes de la familia azo, colorantes de la familia del trifenilmetano y colorantes de la familia BODIPY®.

El ensayo comprende a menudo una sonda marcada con un marcador fluorescente y un resto inactivador. En algunas realizaciones, el resto inactivador se selecciona del grupo que consiste en colorantes de la familia de fluoresceína, colorantes de la familia de polihalofluoresceína, colorantes de la familia de hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de cumarina, colorantes de la familia de rodamina, colorantes de la familia de cianina, colorantes de la familia de oxazina, colorantes de la tiazina, colorantes de la familia de la escuaraina, colorantes de la familia de lantánidos quelados, colorantes de la familia BODIPY®, colorantes de la familia azo; colorantes de la familia de trifenilmetano, restos inactivadores de baja fluorescencia (es decir, "donantes de dim") y restos inactivadores fluorescentes (por ejemplo, los denominados "inactivadores oscuros" incluyendo Black Hole Quenchers™ (BHQ)).

Colorantes obtenidos a partir de rodamina

La rodamina es un colorante fluorescente que contiene una estructura del núcleo tal como se muestra en la Figura 1A. Varios derivados de rodamina, tales como Carboxitetrametilrodamina (TAMRA) y cloruro de ácido de sulforrodamina 101 (Rojo Texas) también son colorantes fluorescentes, usados normalmente con fines de formación de imágenes. En la Patente de Estados Unidos N.º 6.184.379, ('379) se han desvelado nuevos derivados de rodamina cuyos máximos de emisión de fluorescencia están en el intervalo de 600 nm. Estos derivados tienen estructuras que se pueden representar con la siguiente fórmula:



5 en la que cada uno de Ca, Cb, Cc y Cd indica un átomo de C, Ca y Cb están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble, y Cc y Cd están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble; X1, X2, X3, X4, X7 y X10 son hidrógeno y X5, X6, X8, X9, X11 y X12 son metilo.

10 R1 y R2 son idénticos o diferentes y se seleccionan entre un grupo que consiste en hidrógeno y alquilo con 1-20 átomos de C, en la que los restos de alquilo están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo hidroxilo, halógeno, ácido sulfónico, amino, carboxi o alcóxicarbonilo, y al menos R1 contiene un grupo que se puede activar; A1, A2, A3, B1 son cualquiera de cloro o flúor y B2 es cualquiera de cloro, flúor o hidrógeno. En la patente '379 también se describen dos compuestos en particular, JA270 y JF9, con un análogo de ácido carboxílico de JA270 (Figura 2) que se muestra como particularmente adecuado como fluoróforo que se puede usar como en un sistema de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

15 Un uso particularmente preferente de JA270 podría ser como un fluoróforo unido a una sonda oligonucleotídica en un ensayo TaqMan[®] que se pueden activar mediante una molécula inactivadora apropiada que también está unida a la sonda. Además, para maximizar la utilidad de JA270 como un marcador fluorescente, podría ser deseable unir un enlazador bifuncional a JA270 que podría permitir la colocación del marcador en cualquier parte dentro de la secuencia de oligonucleótidos de la sonda. Un enlazador bifuncional adecuado podría ser L-treoninol o (2R,3R)-2-amino-1,3-butanodiol (Figura 1B), que puede formar un enlace amida con JA270, y que se puede unir en ambos
20 restos de hidroxilo con grupos reactivos convencionales para síntesis de oligonucleótidos tales como fosforamidita y grupos de bloqueo tales como 4,4'-dimetoxitritilo (DMT). Como se describe en la presente invención, la colocación del colorante JA270 en el SIP interno del oligonucleótido sonda podría presentar una mejora inesperada de la estabilidad y función de la sonda.

25 *Polimorfismos en el gen de la Apolipoproteína E (apoE)*

La ApoE es un componente principal de diversas especies de lipoproteína y desempeña un papel fundamental en el control de los niveles de colesterol en plasma. El gen que codifica la apoE está presente en formas heterogéneas,
30 algunas de las cuales se sabe que influyen de forma diferencial en la actividad transcripcional o codifican de forma estructural y funcional distintas isoformas de proteína. Las tres isoformas principales de apoE, denominadas apoE2, apoE3, y apoE4, tienen diferentes afinidades de unión hacia el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), y están asociadas con diferentes niveles de lípidos y lipoproteínas en plasma. Estas tres isoformas principales se caracterizan por la presencia de cistina (Cys) para las formas apoE2 y apoE3 y arginina (Arg) para la forma apoE4
35 en la posición 112 de la cadena polipeptídica de apoE y Cys para la forma apoE2 y Arg para las formas apoE3 y apoE4 en la posición 158. La variabilidad de los aminoácidos 112 y 158 se basa en polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) presentes en las posiciones 334 y 472 del nucleótido, respectivamente, del gen de apoE. En cualquier posición, Cys está determinada por el codón TGC y Arg está determinada por el codón CGC. En el presente documento, estos alelos se denominan los alelos 334T/C y los alelos 472 T/C. Las combinaciones,
40 334T/472T, 334T/472C y 334C/472C forman los alelos de apoE específicos de la isoforma, ε2, ε3, y ε4, respectivamente.

El interés en la formación de genotipos de apoE ha sido elevado debido a su reconocimiento por proporcionar una información valiosa en la identificación de individuos con riesgo de enfermedades cardiovasculares y neurológicas.

En particular, se encontró que la presencia del alelo $\epsilon 4$ de apoE estaba asociada con la patogénesis de la enfermedad arterial periférica y coronaria, así como trastornos neurodegenerativos que incluyen las formas familiares esporádica y de inicio tardío de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos usados normalmente para la formación de genotipos incluyen análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción de PCR (PCR-RFLP) y PCR seguido de secuenciación o espectrometría de masas, pero ambos son métodos que consumen tiempo y de bajo rendimiento. También se ha descrito la formación de genotipos mediante PCR en tiempo real usando cualquiera de cebadores específicos de alelo o sondas específicas de alelo (Calero *et al.*, J. Neurosci Methods. 2009, 183 (2): 238-40; Koch *et al.*, Clin. Chem. Lab Med. 2002, 40: 1123-1131) y se ha mostrado que son alternativas rápidas y eficaces. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar reactivos usados en ensayos de PCR en tiempo real, tales como la tecnología de TaqMan[®], que puedan formar genotipos de forma tanto rápida como precisa de los alelos de apoE.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se establece en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Análisis de un oligonucleótido de control marcado con JA270 usado para calibración

Se produjo una solución de reactivo de referencia a usar para calibración de detección de fluorescencia y contenía cinco oligonucleótidos de desoxitimidina (dT) 10-meros a una concentración de 2 μ M todos marcados en el nucleótido en la posición 5' terminal usando cinco colorantes fluorescentes diferentes. Los cinco colorantes fluorescentes eran FAM, HEX, JA270, Cumarina-343, y Cy5.5. La pureza y estabilidad de esta solución de referencia se analizó con un Sistema para UPLC Waters Acquity con Matriz de Fotodiodo (PDA) y detección de fluorescencia. La cromatografía se realizó en una columna Acquity OST C8 de partícula de 1,7 μ m. Las fases móviles consistían en Acetato de hexilamonio 0,1 M (HAA) a pH 7,0 como el Tampón A y acetonitrilo al 100 % como el Tampón B y los oligonucleótidos se separaron a través de un gradiente de Tampón B al 30-60 % durante los primeros 0,6 minutos, y seguido del Tampón B al 60-95 % durante 1,4 minutos, a un caudal de 1 ml/min. Los perfiles de elución de los oligonucleótidos para un experimento realizado por la mañana (parte superior) y por la tarde (parte inferior) del mismo día se muestra en la Figura 3. De manera interesante, el pico de JA270 tenía un tamaño mucho más reducido en la realización de la tarde, lo que sugiere posibles problemas con la estabilidad de este oligonucleótido en particular. Se sospechaba que debido al tamaño y la hidrofobia del colorante JA270, este oligonucleótido en particular podría caer fuera de la solución. Para disminuir la hidrofobia del oligonucleótido marcado con JA270, se determinó la síntesis del dT de 10-meros marcado con JA270 con el JA270 colocado en una posición interna en lugar de en el extremo 5' terminal. La colocación interna del colorante JA270 se hizo posible mediante la unión del enlazador L-treoninol al resto de ácido carboxílico del colorante y mediante la adición de un grupo fosforamídita reactivo que permite la unión con un fosfato interno dentro del oligonucleótido. El análisis de UPLC se realizó de nuevo y los resultados se muestran en la tabla y en el gráfico de barras representados en la Figura 4. Al colocar el colorante JA270 en el sitio interno del oligonucleótido, la estabilidad del dT de 10-meros marcado con JA270 se pudo mantener incluso después de un mes de almacenamiento.

Ejemplo 2 Análisis de una sonda marcada con JA270 para formación de genotipos de apoE

Un ensayo para formar genotipos de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, y $\epsilon 4$ del gen de apoE se desarrolló usando tecnología usando TaqMan[®] y oligonucleótidos de sonda de TaqMan[®] específicos de alelo. Se preparó una solución de oligonucleótidos de "mezcla madre" y contenía las siguientes sondas:

Sonda 22-meros marcada con FAM en el extremo en la posición 5' selectiva para el alelo 334T

Sonda 22-meros marcada con HEX en el extremo en la posición 5' selectiva para el alelo 334C

Sonda 22-meros marcada con JA270 en el extremo en la posición 5' selectiva para el alelo 472C

Sonda 22-meros marcada con Cy5.5 en el extremo en la posición 5' selectiva para el alelo 472T

La solución de "mezcla madre" se analizó a la composición y estabilidad correctas mediante UPLC usando una columna de partícula de 1,7 μ m, Acquity OST C18. Las fases móviles consistían en Acetato de trietilamonio 0,1 M (TEAA) a pH 7,0 como Tampón A y acetonitrilo al 100 % como Tampón B y los oligonucleótidos se separaron a través de un gradiente de Tampón B al 5-60 % durante 3 minutos a un caudal de 1 ml/min. El perfil de elución de una solución "recién preparada" en el Día 0 se muestra en la Figura 5 en la que se podían observar picos del oligonucleótido para las cuatro sondas y los dos cebadores de PCR. Sin embargo, como se observa en la Figura Figure 6, cuando esta solución se analizó después de tres días de almacenamiento a 4 °C, el pico para el oligonucleótido marcado con JA270 había desaparecido. Similar a lo que se creía que era la razón de la inestabilidad del oligonucleótido dT de referencia marcado con JA270 en el extremo 5' terminal en el Ejemplo 1, también se creía que la inestabilidad de la sonda de apoE marcada con JA-270 se debía a la agregación del oligonucleótido su caída

fuera de la solución.

Para resolver el problema de la inestabilidad, la longitud de la sonda marcada con JA270 se aumentó primero desde un oligonucleótido de 22-meros a un oligonucleótido de 25-meros. Una versión de la sonda de 25-meros todavía colocaba a JA270 en el extremo en la posición 5' terminal (denominada sonda R33) mientras que en otra versión, el colorante JA270 se colocaba ahora internamente entre los nucleótidos 12 y 13 (denominado sonda R34). La colocación interna del colorante se hizo posible uniendo el enlazador de L-treoninol al resto de ácido carboxílico en JA270. A continuación, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real usando las dos sondas R33 y R44 en tampones y condiciones que se enumeran en las Tablas 1 y 2 que siguen a continuación. Para generar curvas de crecimiento de PCR específicas de alelo se usó un molde de plásmido encontró positivo que portaba un alelo 472C y un molde de plásmido de control negativo que portaba un alelo 472T para comparar el rendimiento de las sondas R33 y R34. La sonda R34 con el colorante JA270 colocado internamente mostraba buena estabilidad sin cambios significativos en las curvas de crecimiento al usar la sonda almacenada durante tres semanas o seis semanas. Por el contrario, como se muestra en la Figura 7, la sonda R33 marcada en el extremo 5' terminal presentaba un enorme declive en las señales de fluorescencia y la curva de crecimiento generada por la sonda que se había almacenado durante tres semanas o seis semanas. Este resultado mostraba claramente que la colocación del colorante JA270 en un sitio interno dentro del oligonucleótido sonda aumentaba de forma considerable la estabilidad y el rendimiento de la sonda.

TABLA 1

R2: Mezcla Madre	Prototipo II			
Componente	Conc. en MMx (2,79x)		Conc. en PCR (final)	
Tricina pH 8,3 (mM)	1674	mM	60	mM
KOH (mM)	38,8	mM	13,9	mM
EDTA (mM)	0,56	mM	02	mM
Glicerol (%)	41,9	%	15	%
Tween 20 (%)	0,056	%	0,02	%
DMSO (%)	5,6	%	2	%
Azida de Na (%)	0,09*	%	N/D	%
dATP (mM)	0,56	mM	0,2	mM
dCTP (mM)	0,56	mM	0,2	mM
dGTP (mM)	0,56	mM	0,2	mM
dUTP (mM)	1,12	mM	0,4	mM
dTTP (mM)	0,14	mM	0,05	mM
Z05 (Unidad/ul)	0,84	U/ul	15	U (o 0,30 U/ul)
Aptámero, 46A (uM)	0,56	uM	0,2	uM
AmpErase UNG (Unidad/ul)	0,167	U/ul	3	U (o 0,060 U/ul)
5'APOE5P05 (uM)	1,12	uM	0,4	uM
3'APOE3P04 (uM)	1,12	uM	0,4	uM
Sonda APOE112C07 (uM) FAM	0,84	uM	0,3	uM
Sonda APOE112R05 (uM) HEX	0,84	uM	0,3	uM
Sonda APOE158R28 (uM) JA270	0,84	uM	0,3	uM
Sonda APOE158C14 (uM) CY5.5	0,56	uM	0,2	uM
	* Concentración en Mezcla Madre			
R1: Cation/Cofactor/KOAc	Prototipo II			
Componente	Conc. en MMx (7,04x)		Conc. en PCR (final)	
Mg (OAc) ₂ , pH 6,5	14,1	mM	2	mM
Mn (OAc) ₂ , pH 6,3	7,04	mM	1	mM
KOAc, pH 8,0 (mM)	634	mM	90	mM

TABLA 2

P4: D96 / D95A65x3 / D94A65x57 (ApoE 2 Etapa P4 040312)					
Diana (°C)	Modo de Adquisición	(hh:mm:ss)	Tasa (°C/s)	Modo de Análisis	N.º de Ciclos
Etapa de UNG					1
50	Ninguno	0:05:00	2,2	Ninguno	
Desnaturalización					1
96	Ninguno	0:00:45	4,4	Ninguno	
Ciclo Previo					3
95	Ninguno	0:00:20	2,2		
65	Individual	0:00:30	2,2	Cuantificación	
PCR					57
94	Ninguno	0:00:20	4,4		
65	Individual	0:00:30	2,2	Cuantificación	

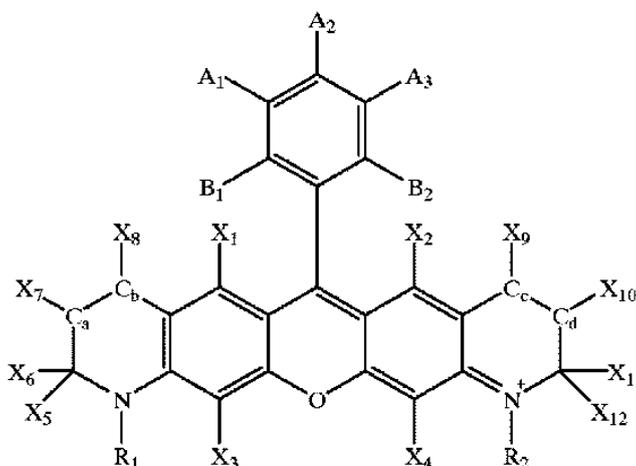
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un oligonucleótido marcado para su uso como una sonda de hibridación en una reacción de PCR que comprende:

- 5 (a) proporcionar un colorante fluorescente que es un derivado de rodamina en el que dicho colorante fluorescente está unido con una molécula enlazadora bifuncional;
- (b) unir un grupo reactivo al colorante fluorescente a través de la molécula enlazadora bifuncional para incorporar dicho colorante fluorescente dentro del oligonucleótido;
- 10 (c) incorporar el colorante fluorescente entre dos nucleótidos internos del oligonucleótido, con la condición de que el colorante fluorescente no se incorpore en el extremo 5' del oligonucleótido,

en el que la molécula enlazadora bifuncional consiste en L-treoninol o (2R,3R)-2-amino-1,3-butanodiol.

15 2. El método de la reivindicación 1 en el que el colorante fluorescente es un compuesto con la fórmula general



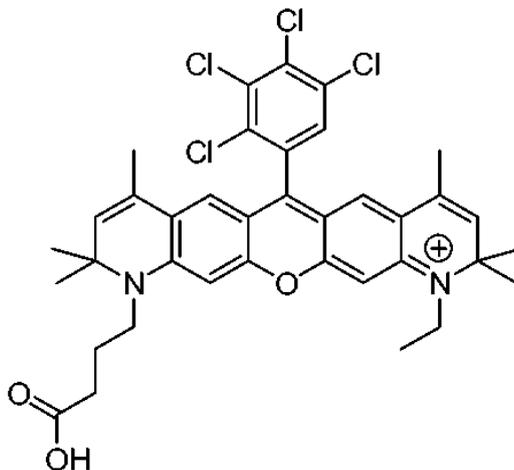
20 en la que cada uno de Ca, Cb, Cc y Cd indica un átomo de C, Ca y Cb están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble, y Cc y Cd están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble;

X1, X2, X3, X4, X7 y X10 son hidrógeno y X5, X6, X8, X9, X11 y X12 son metilo;

25 R1 y R2 son idénticos o diferentes y se seleccionan entre un grupo que consiste en hidrógeno y alquilo con 1-20 átomos de C, en la que los restos de alquilo están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo hidroxilo, halógeno, ácido sulfónico, amino, carboxi o alcóxicarbonilo, y al menos R1 contiene un grupo que se puede activar;

A1, A2, A3, B1 son cloro o flúor y B2 es cloro, flúor o hidrógeno.

3. El método de la reivindicación 2 en el que el colorante fluorescente es:



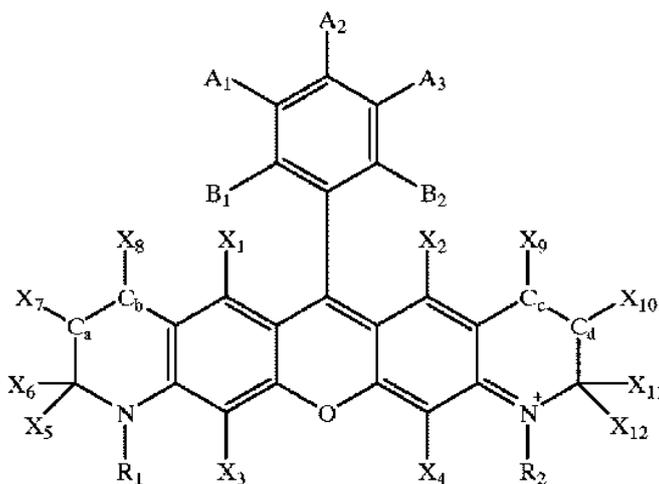
30 4. El método de la reivindicación 1 en el que el oligonucleótido marcado comprende adicionalmente una molécula inactivadora unida en el extremo 5' del oligonucleótido marcado.

5. Un método para detectar, en una muestra de ensayo, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico diana o de un alelo diana de un ácido nucleico, que comprende:

5 realizar una reacción de PCR con el uso de un oligonucleótido sonda marcado que se hibrida con el ácido nucleico diana, en el que el oligonucleótido sonda marcado se caracteriza por que tiene:

10 un colorante fluorescente que es un derivado de rodamina que se une con una molécula enlazadora bifuncional; y un grupo reactivo unido a la molécula enlazadora bifuncional para incorporar el colorante fluorescente entre dos nucleótidos internos del oligonucleótido, con la condición de que el colorante fluorescente no se incorpore en el extremo 5' del oligonucleótido, en el que la molécula enlazadora bifuncional consiste en L-treoninol o (2R,3R)-2-amino-1,3-butanodiol; detectar la señal del colorante fluorescente en el que la intensidad de dicha señal representa la presencia o la ausencia del ácido nucleico diana.

15 6. El método de la reivindicación 5 en el que el colorante fluorescente es un compuesto con la fórmula general



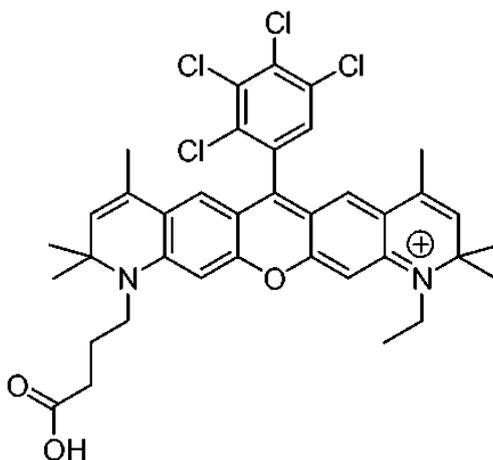
20 en la que cada uno de Ca, Cb, Cc y Cd indica un átomo de C, Ca y Cb están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble, y Cc y Cd están unidos en conjunto mediante un enlace sencillo o mediante un enlace doble;

X1, X2, X3, X4, X7 y X10 son hidrógeno y X5, X6, X8, X9, X11 y X12 son metilo; \

25 R1 y R2 son idénticos o diferentes y se seleccionan entre un grupo que consiste en hidrógeno y alquilo con 1-20 átomos de C, en la que los restos de alquilo están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo hidroxilo, halógeno, ácido sulfónico, amino, carboxi o alcóxicarbonilo, y al menos R1 contiene un grupo que se puede activar;

A1, A2, A3, B1 son cloro o flúor y B2 es cloro, flúor o hidrógeno.

30 7. El método de la reivindicación 6 en el que el colorante fluorescente es:



8. El método de la reivindicación 5 en el que el oligonucleótido marcado comprende adicionalmente una molécula inactivadora unida en el extremo 5' del oligonucleótido marcado.

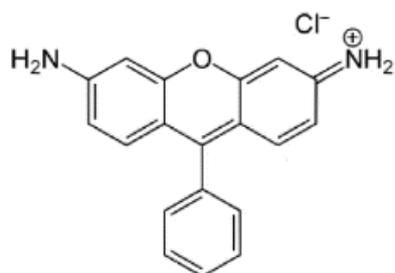
9. El método de la reivindicación 5 en el que el ácido nucleico diana es el gen de la apolipoproteína E.

5

10. El método de la reivindicación 5 en el que el alelo diana de un ácido nucleico es el alelo 334T/C o el alelo 472 T/C del gen de la apolipoproteína E.

FIGURA 1

(A)



(B)

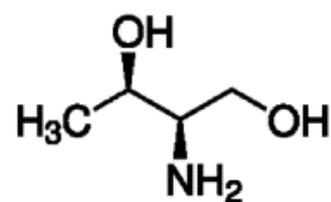


FIGURA 2

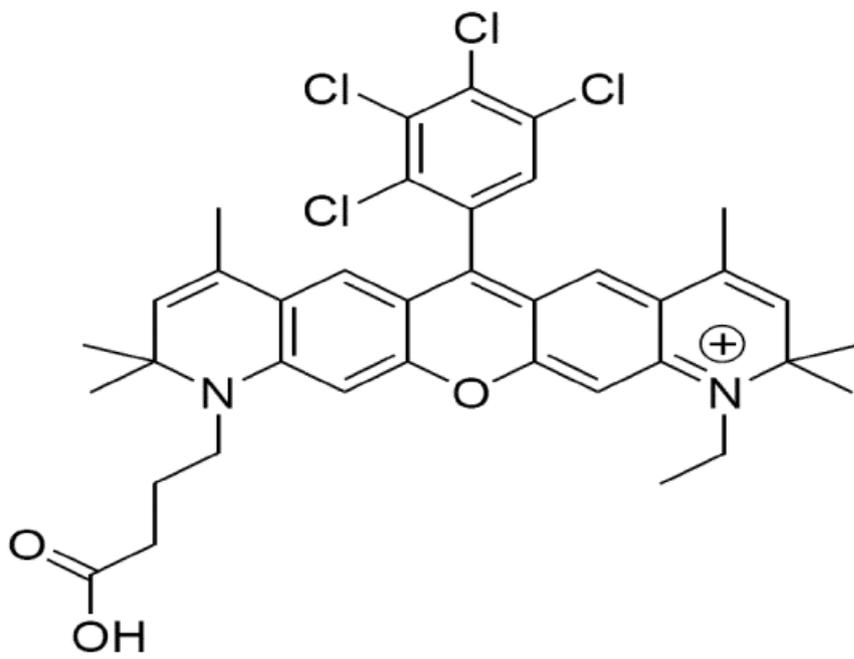
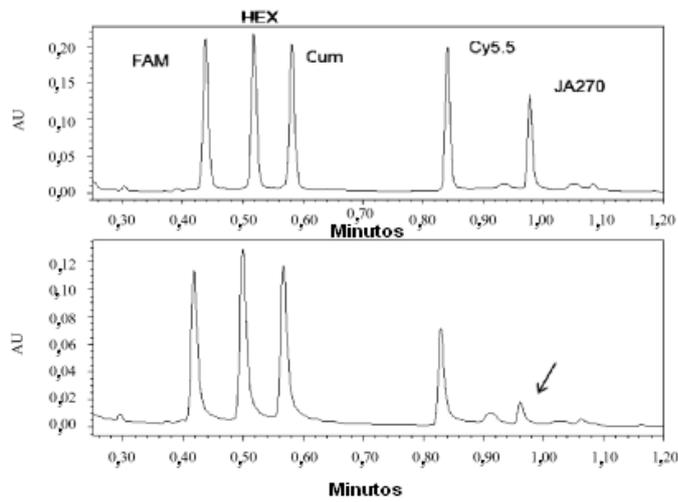


FIGURA 3

Análisis de UPLC de mezcla de colorante de 5, mezcla 2 uM



Todos hebra oligo T10, todos colorantes en 5',

FIGURA 4

Colorante	Referencia 20 nM, Área del Pico	Día 0, Área del Pico	1 Mes 4C, Área del Pico	1 Mes 37C, Área del Pico	Día 0, % de Referencia	1 Mes 4C, % de Referencia	1 Mes 37C, % de Referencia
Cum-343	1.380.537	1.334.154	1.372.225	1.333.549	96,6 %	99,4 %	96,6 %
FAM	1.598.547	1.544.356	1.555.541	1.570.641	96,6 %	97,3 %	98,3 %
HEX	2.755.447	2.491.573	2.757.362	2.753.181	90,4 %	100,1 %	99,9 %
JA270	87.727	80.157	85.790	87.516	91,4 %	97,8 %	99,8 %
Cy5 5	4.620	4.478	4.546	4.685	96,9 %	98,4 %	101,4 %

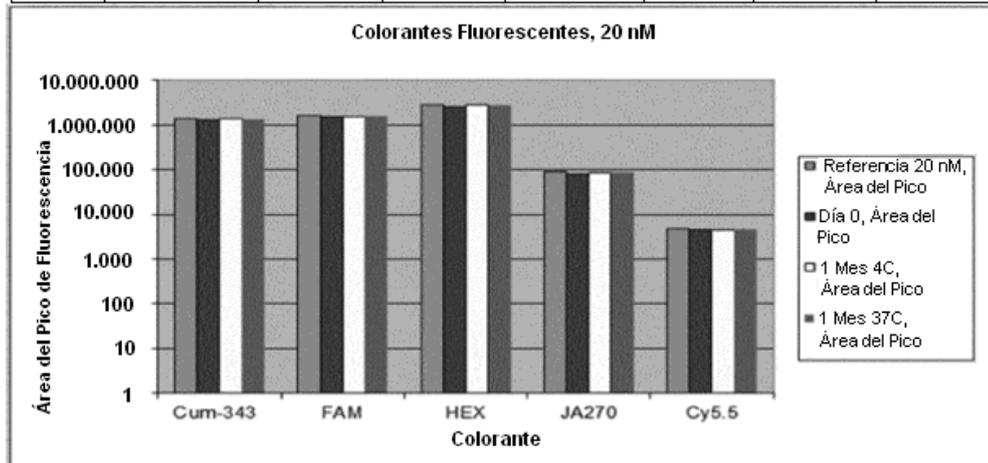


FIGURA 5

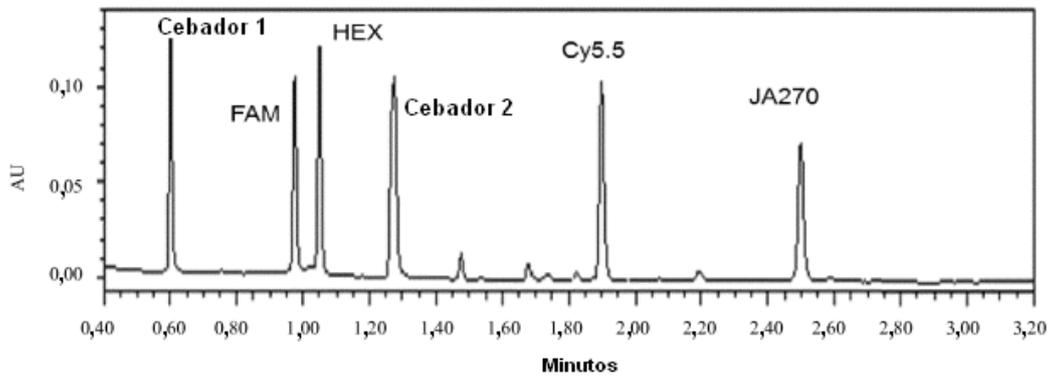


FIGURA 6

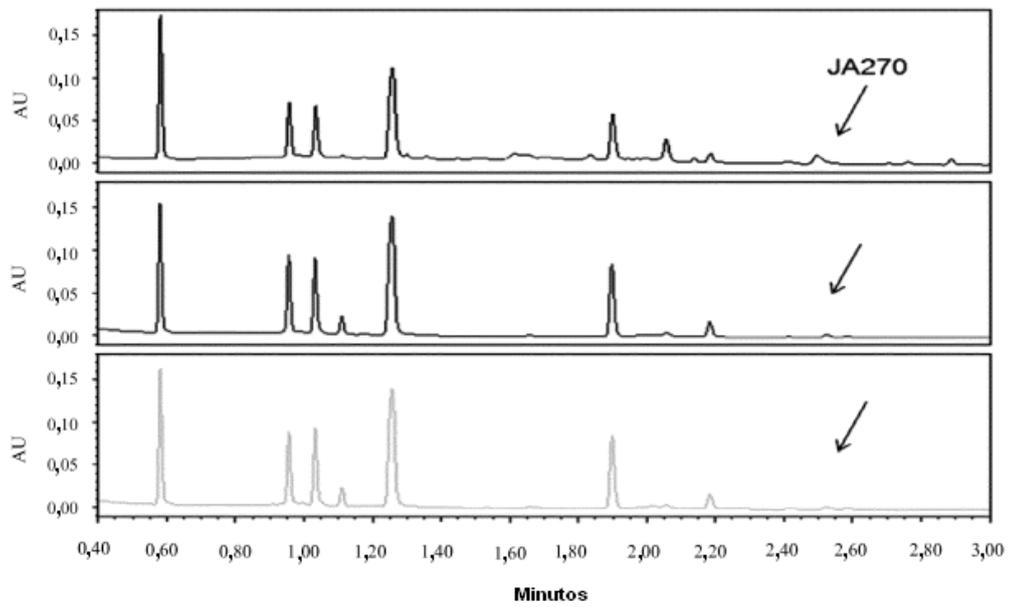


FIGURA 7

Comparación de Estabilidad de APOE158R33: Día 0, Semana 3, Semana 6 (5/29/12)
 Canal 3

