

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 750**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2012 PCT/GB2012/050645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO2013140107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012 E 12710994 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2828399**

54 Título: **Sistema de detección de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos que comprenden un grupo fosforotioato**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:
**LGC GENOMICS LIMITED (100.0%)
Queens Road Teddington
Middlesex TW11 0LY, GB**

72 Inventor/es:
**ROBINSON, PHILIP STEVEN;
HOLME, JOHN y
JAIN, NISHA**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 620 750 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

Sistema de detección de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos que comprenden un grupo fosforotioato

5

La presente invención se refiere a métodos y kits para la detección de ácido nucleico en un sistema de ensayo.

Antecedentes de la invención

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un potente método para realizar una amplificación rápida y exponencial de secuencias de ácidos nucleicos diana. La PCR ha facilitado el desarrollo de las tecnologías de caracterización génica y clonación molecular, incluyendo la secuenciación directa de ADN amplificado por PCR, la determinación de variación alélica y la detección de patologías infecciosas y genéticas. PCR se realiza a través de ciclos repetidos de desnaturalización térmica de un molde de ADN que contiene la secuencia diana, por hibridación
15 de los cebadores contrarios con las cadenas de ADN complementarias y la extensión de los cebadores hibridados con ADN polimerasa. Los múltiples ciclos de PCR tienen como resultado la amplificación exponencial de la secuencia de nucleótidos delineada por los cebadores de amplificación flanqueantes. La incorporación de una ADN polimerasa termoestable en el protocolo de PCR obvia la necesidad de repetidas adiciones de enzima y permite unas temperaturas de hibridación y extensión del cebador que potencian la especificidad de las asociaciones cebador : molde. Taq ADN polimerasa sirve por tanto para aumentar la especificidad y simplicidad de PCR.

En muchas reacciones basadas en PCR, se emplea un sistema de producción de señal, p.ej. para detectar la producción de producto amplificado. Un tipo de sistema de producción de señal que se utiliza en las reacciones basadas en PCR es el sistema de transferencia de energía fluorescente (FRET), en el que un detector de ácido nucleico incluye grupos dador y aceptor de la fluorescencia. Los sistemas de marcado FRET incluyen una serie de ventajas con respecto a otros sistemas de marcado, incluyendo la capacidad para llevar a cabo ensayos homogéneos en los que no se requiere una etapa de separación del detector de ácido nucleico marcado unido del no unido. Un problema primordial de muchas de las técnicas de la técnica anterior está asociado con la síntesis de oligonucleótidos fluorescentes marcados dualmente. En la Solicitud de patente europea EP1726664, se describe un sistema de detección que resuelve este problema mediante el uso de secuencias de oligonucleótido de marcado simple de diferentes temperaturas de fusión (Tf) que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par fluorescente desactivado, que tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible, teniendo una de las secuencias una Tf que está por debajo de la temperatura de hibridación (Th) del proceso PCR.

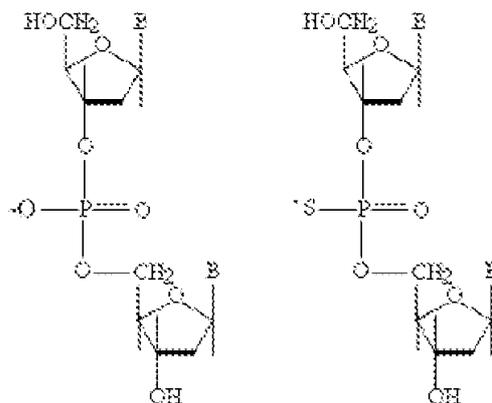
35 En los sistemas de detección en los que se utiliza un detector de ácido nucleico marcado, es crítica una amplificación de alta fidelidad. Dada la naturaleza del proceso PCR y Taq ADN polimerasa, dichos métodos pueden sufrir reacciones secundarias alternativas a la reacción de polimerización deseada. Por ejemplo, PCR puede sufrir una amplificación no específica cuando se ensambla la reacción a temperatura ambiente. A temperaturas por debajo de las de PCR, Taq polimerasa retiene una fracción de su actividad y puede por tanto extender cebadores que no se hibridan por complementariedad, llevando a la formación de productos no deseados. La región recién sintetizada actúa entonces como molde para la posterior extensión de cebador y síntesis de productos de amplificación no deseados. Sin embargo, si se calienta la reacción a temperaturas en torno a 50 °C o superiores antes de que comience la polimerización, aumenta la rigurosidad de la hibridación de cebador y se evita o se reduce la síntesis de productos de PCR no deseados.

La unión cebador-dímero es también una reacción secundaria habitual que afecta a la PCR. La acumulación de cebador-dímero tiene lugar por la hibridación y extensión de los cebadores entre sí. La formación de cebador-dímero tiene como resultado la supresión de los reactivos y, en consecuencia, una reducción global de la eficacia de la PCR.

La PCR de arranque en caliente es un método para reducir la amplificación no específica y limitar así la formación de cebadores-dímeros, habiéndose desarrollado muchos enfoques diferentes para conseguirlo, véase por ejemplo, Moretti, T. et al. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. BioTechniques 25, 716-22 (1998) and Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance Nucleic Acids Res (2008) 36(20): e131. Sin embargo, dichas técnicas únicamente consiguen un alivio parcial de estos problemas. Dado que cualquier error en las secuencias, las reacciones no basadas en la polimerización o un cebado incorrecto del cebador, como por ejemplo dimerización de cebador, pueden causar la producción de una señal débil o una señal errónea, sería deseable, sobre todo en PCR específica de alelo, una mayor mejora de estas señales débiles o incorrectas.

Los fosforotioatos (o S-oligos) son una variante de ADN normal en la que uno de los oxígenos sin puente se reemplaza por azufre. A continuación, se exponen ejemplos de uniones de internucleótido de fosfodiéster y fosforotioato:

65



El enlace fosforotioato sustituye por un átomo de azufre el oxígeno sin puente en la cadena principal de fosfato del oligonucleótido, haciendo que la unión de internucleótido sea resistente a la degradación de nucleasa. Se puede introducir fosforotioatos tanto en el extremo 5' como 3' del oligo para inhibir la degradación de exonucleasa. En los oligonucleótidos antisentido, se introducen también los fosforotioatos internamente para limitar el ataque de endonucleasas. La síntesis de oligonucleótidos que contienen fosforotioato se describe por ejemplo en Verma S. and Eckstein, F. (1998). MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES: Synthesis and Strategy for Users. Annu. Rev. Biochem. 1998. 67:99-134 y Curr Protoc Nucleic Acid Chem. Mar 2009; Capítulo 4: Unidad 4.34. DNA oligonucleotides containing stereodefined phosphorothioate linkages in selected positions. Nawrot B, Rebowska B.

Tal como se ha mencionado antes, la sulfuración del enlace internucleótido reduce la acción de endo- y exonucleasas incluyendo 5' → 3' y 3' → 5' ADN POL 1 exonucleasa, nucleasas S1 y P1, ARNasas, nucleasas en suero y fosfodiesterasa en el veneno de serpiente. El atributo de resistencia a nucleasa del S-oligo en combinación con la PCR de alta fidelidad empleando exo + ADN polimerasas ha sido demostrado, véase por ejemplo, Nucl. Acids Res. (2003) 31 (3): e7. doi: 10.1093/nar/gng007. Taq DNA polymerase possesses no 3' → 5' Exonuclease (Kenneth R. Tindall, Thomas A. Kunkel, Biochemistry, 1988, 27 (16), p 6008-6013). Se ha notificado asimismo una mejor discriminación de polimorfismos de un solo nucleótido mediante modificación con fosforotioato en presencia de una polimerasa de corrección de pruebas. La modificación con fosforotioato aumenta la especificidad, reduciendo las incidencias de interacción cebador-dímero, si bien, se ha notificado que se necesita la funcionalidad 3'-nucleasa para mejorar la PCR y se ha demostrado que en combinación con la PCR específica de alelo, el uso de S-oligos no ofrece ningún beneficio cuando se utiliza en combinación con Taq ADN polimerasa, véase por ejemplo Zhang, J. and Li, K. (2003) Single-Base Discrimination Mediated by Proofreading 3' Phosphorothioate-Modified Primers. Molecular Biotechnology 25, 223-227.

Existe la necesidad de sistemas de detección específicos, económicos, fiables y fáciles de sintetizar para su uso en la detección de productos de extensión de cebador, p.ej. en ensayos de PCR homogéneos, que aborden los problemas con los que se topan los sistemas de detección para PCR existentes. En contraposición con el conocimiento científico convencional, la presente invención se basa en el hallazgo de que se pueden utilizar satisfactoriamente S-oligos con el resultado de mejoras en los sistemas de ensayo de detección de ácidos nucleicos.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 15 adjuntas.

La presente divulgación proporciona un método para reducir la amplificación no específica y/o la formación de cebadores-dímeros en una reacción de extensión de cebador dependiente de molde que comprende llevar a cabo una reacción de extensión de cebador en presencia de una polimerasa que carece de actividad nucleasa 3' → 5' conteniendo uno o más de los cebadores al menos un grupo fosforotioato.

Se proporcionan asimismo kits y composiciones para su uso en dichos métodos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema de reacción simple para la detección directa de una secuencia de ADN empleando el método que engloba el método de la presente invención

La Figura 2 es un esquema de reacción simple para la detección indirecta (tiempo real) de una secuencia de ADN que engloba el método de la presente invención.

La Figura 3 es un esquema de reacción simple para la detección indirecta (de punto final) de la secuencia de ADN en genotipificación de SNP que engloba el método de la presente invención.

La Figura 4 muestra los datos generados utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 1, más adelante.

La Figura 5 muestra una comparación de los datos generados en los sistemas de ensayo empleando secuencias de oligonucleótido que contienen grupos fosforotioato y oligonucleótidos que no contiene fosforotioato, tal como se describe en Ejemplo 2, más adelante.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente divulgación se proporciona un método para reducir la amplificación no específica y/o la formación de cebadores-dímeros en una reacción de extensión de cebador dependiente de molde que comprende llevar a cabo la reacción de extensión de cebador en presencia de una polimerasa que carece de actividad nucleasa 3'→5', conteniendo uno o más de los cebadores al menos un grupo fosforotioato.

El método de la presente divulgación comprende preferiblemente el uso de al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente, que tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible, estando modificado uno o más de los cebadores con al menos un grupo fosforotioato.

En un modo de realización de la presente divulgación, las dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple tienen diferente Tf. Cuando las secuencias de oligonucleótido tienen diferente Tf, entonces una de las secuencias puede tener una Tf que está a la Th de la reacción de extensión del cebador, p.ej. proceso de PCR, o por debajo de ella. La otra secuencia puede tener una Tf que no está adecuadamente por debajo de la Th, sino, preferiblemente, por encima de ella y, más preferiblemente, sustancialmente por encima de ella. En un modo de realización, el oligonucleótido desactivador tiene una Tf por encima de la Th.

Una de las fórmulas que se utiliza habitualmente para determinar la Tf de una secuencia es $Tf=4(G+C)+2(A+T)$, según la cual la Tf baja de una secuencia se puede conseguir en principio por una longitud más corta y/o una menor relación $(G+C)/(A+T)$ con respecto a la otra secuencia del par indicador.

En algunos de los aspectos de la presente divulgación es preferible que una de las secuencias de oligonucleótido de marcado simple sea 10 bases más larga que la otra, y preferiblemente al menos 15 bases más larga.

La invención proporciona un método para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5', comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple, p.ej. de diferente Tf, que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente que, tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible cuando la secuencia complementaria se hibrida con una de las al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple, conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato;
- b) proporcionar al menos un cebador e iniciar la reacción de extensión de cebador generando en virtud de ello una secuencia complementaria para al menos una de las secuencias de nucleótido de marcado simple; y
- c) medir la señal detectable que se genera

cuando se hibrida la secuencia complementaria con una de las al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple.

En otro aspecto más de la presente invención, el método comprende un método para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5' utilizando PCR, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar al menos una primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple y al menos una segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, p.ej. siendo la primera y la segunda secuencia de oligonucleótidos de diferente Tf, en la que se hibridan las secuencias de oligonucleótido primera y segunda entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente y al menos un cebador y p.ej., teniendo una entre la primera y segunda secuencia de nucleótido una Tf a la Th del proceso de PCR, o por debajo de ella, conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato, comprendiendo el al menos un cebador al menos un cebador de cola sin marcar, teniendo el cebador de cola sin marcar una región de cola, comprendiendo la región de cola una secuencia de oligonucleótidos complementaria con una secuencia de oligonucleótidos de la segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, siendo la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple un cebador a partir del cual se inicia la síntesis de ADN una vez generada la secuencia complementaria de la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple durante el proceso de PCR, de manea que la segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple deja de ser capaz de hibridarse con la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, en virtud de lo cual se genera una señal medible.

- b) iniciar la reacción de extensión de cebador en virtud de lo cual se genera una secuencia complementaria para al menos una de las secuencias de oligonucleótidos de marcado simple; y
 c) medir la señal detectable que se genera cuando se hibrida la secuencia complementaria con la primera secuencia de nucleótidos de marcado simple.

5 En un aspecto de la invención aún más preferible, el método comprende un método para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5' utilizando PCR, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) proporcionar una primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple y al menos una segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, p.ej. teniendo una Tf diferente la primera y la segunda secuencia de oligonucleótidos, en la que se hibridan la primera y la segunda secuencia de oligonucleótidos entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente y al menos un cebador y, p.ej., teniendo una
 15 entre la primera y la segunda secuencias de nucleótidos una Tf que está a la Th del proceso de PCR, o por debajo de ella, conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato, comprendiendo el al menos un cebador al menos un cebador de cola sin marcar, teniendo el cebador de cola sin marcar una región de cola, comprendiendo la región de cola una secuencia de oligonucleótidos idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de oligonucleótidos de la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, siendo la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple un cebador a partir del cual
 20 se inicia la síntesis de ADN una vez generada una secuencia complementaria para la primera secuencia de nucleótidos de marcado simple durante el proceso de PCR, de manera que la segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple deja de ser capaz de hibridarse con la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, generando en virtud de ello una señal medible;
 b) iniciar la reacción de extensión de cebador en virtud de lo cual se genera una secuencia complementaria para
 25 al menos una de las secuencias de oligonucleótidos de marcado simple; y
 c) medir la señal detectable que se genera cuando se hibrida la secuencia complementaria con la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple.

30 La invención proporciona asimismo un kit para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5', que comprende 1) al menos dos secuencias de oligonucleótidos de marcado simple, p.ej. de diferente Tf, que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente que, tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible cuando se hibrida la secuencia complementaria con una de las al menos dos secuencias de oligonucleótidos de marcado simple; y 2) una polimerasa que carece de actividad
 35 exonucleasa 3' a 5'; conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótidos al menos un grupo fosforotioato, conteniendo al menos una de las bases internas de la al menos una secuencia de oligonucleótidos un grupo fosforotioato y teniendo la al menos una secuencia de oligonucleótidos que contiene el al menos un grupo fosforotioato de 20 a 80 %, opcionalmente, de 30 a 70 % de las bases modificadas con el grupo fosforotioato; y opcionalmente, estando separadas las bases modificadas por al menos una base sin modificar y/o siendo
 40 fosforotioatos bases alternas.

Los kit de acuerdo con la invención también pueden contener otros componentes adecuados para su uso en reacciones de extensión de cebador, tales como sales de magnesio, dNTP, etc.

45 En la presente invención, todos o al menos un cebador utilizado en los cebadores utilizados en los métodos puede contener bases modificadas con fosforotioato. El número de uniones fosfodiéster reemplazadas por fosforotioatos en cualquier cebador dado puede oscilar entre uno y todos los enlaces fosfodiéster reemplazados por fosforotioatos. El (los) cebador(es) puede(n) contener fosforotioatos en los extremos 5' y/o 3', sin embargo, es preferible que, como alternativa, o además de dichas modificaciones terminales, al menos una de las bases internas del cebador sea un
 50 fosforotioato. Por ejemplo, pueden ser fosforotioatos 10-90 %, 20-80 %, 30-70 % o 40-60 % de las bases. En un modo de realización, las bases modificadas con fosforotioato están separadas por al menos uno, p.ej. de uno a tres, bases (fosforodiéster) sin modificar. En un modo de realización preferible, bases alternas dentro del (los) cebador(es) son fosforotioatos

55 El uso de modificación con fosforotioato sobre bases alternas de cebadores marcados con fluoróforo (denominadas en el presente documento semi-modificación S) en combinación con desactivadores sin modificar representa un modo de realización preferible de la invención, ya que ofrece una discriminación particularmente potenciada e intensidad de señal de la PCR.

60 A continuación, se ilustran ejemplos de diferentes modificaciones con fosforotioato que se pueden utilizar en la presente invención, en cebadores marcados con fluoróforos o desactivadores, en los que * representa un fosforotioato:

Fluor FAM sin modificar: 5'-FAM- GCGATTAGCCGTTAGGATGA 3'

65 Fluor FAM 3' S: 5'-FAM- CGATTAGCCGTTAGGATG* A 3'

ES 2 620 750 T3

Fluor FAM Semi S: 5'-FAMG*CG*AT*TA*GC*CG*TT*AG*GA*TG*A 3'

Fluor FAM completamente S: 5'-FAMG*C*G*A*T*T*A*G*C*C*G*T*AG*G*A*T*G*A 3'

5 Fluor HEX sin modificar: 5'-HEX- GTCGGTGAACAGGTTAGAGA 3'

Fluor HEX 3' S: 5'-HEX- GTCGGTGAACAGGTTAGAG* A 3'

10 Fluor HEX Semi S: 5'-HEXG*TC*GG*TG*AA*CA*GG*TT*AG*AG*A 3'

Fluor HEX completamente S: 5'-HEXG*T*C*G*G*T*G*A*A*C*A*G*G*T*T*A*G*A*G*A 3'

Desactivador FAM normal: 5' CCTAACGGCTAATCGC-3'Dabsyl

15 Desactivador FAM Semi S V1.0: 5'C*CT*AA*CG*GC*TA*AT*CG*C -3'Dabsyl

Desactivador FAM Semi S V2.0: 5'CC*TA*AC*GG*CT*AA*TC*GC -3'Dabsyl

20 Desactivador FAM Completamente S: 5'C*C*T*A*A*C*G*G*C*T*A*A*T*C*G*C -3'Dabsyl

Desactivador HEX Completo S: 5' AACCTGTTCACCGAC-3'Dabsyl

Desactivador HEX Semi S V1.0: 5'AA*CC*TG*TT*CA*CC*GA*C-3'Dabsyl

25 Desactivador HEX Semi S V2.0: 5'A*AC*CT*GT*TC*AC*CG*AC-3'Dabsyl

Desactivador HEX completamente S: 5'A*A*C*C*T*G*T*T*C*A*C*C*G*A*C-3'Dabsyl

30 Las secuencias de oligonucleótido que contienen al menos un grupo fosforotioato para su uso en la presente invención se pueden sintetizar a través de métodos conocidos entre los especialistas en la técnica.

La presente invención encuentra uso en diversas aplicaciones diferentes, siendo particularmente adecuada para su uso en reacciones basadas en PCR, incluyendo aplicaciones de detección de SNP, aplicaciones de detección de variación alélica, PCR en tiempo real y similares.

35 Tal como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación proporciona métodos para reducir la amplificación no específica y/o la formación de cebadores-dímeros en una reacción de extensión de cebador dependiente de molde y para detectar la producción de productos de extensión de cebador en una mezcla de reacción de extensión de cebador, p.ej. determinando si los productos de extensión de cebador se producen o no en una reacción de extensión de cebador. Se entiende por producto de extensión de cebador una molécula de ácido nucleico que resulta de una reacción de extensión de cebador dependiente de molde. Las reacciones de extensión dependientes de molde son las reacciones en las que una polimerasa extiende la molécula de cebador de ácido nucleico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico molde, determinándose la secuencia de bases que se añade al extremo de la molécula de ácido nucleico del cebador por la secuencia de bases en la cadena del molde. Las reacciones de extensión de cebador dependientes de molde incluyen reacciones de extensión de cebador tanto de amplificación como de no amplificación. En algunos modos de realización de la presente invención, la reacción de extensión del cebador dependiente de molde en la que se detecta la producción de los productos de extensión de cebador es una reacción de amplificación, p.ej. una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

50 En la presente divulgación, la reacción de extensión de cebador dependiente de molde en la que se detecta la producción de los productos de extensión de cebador es una reacción que contiene cebadores modificados con grupos fosforotioato en combinación con polimerasas que carecen de actividad nucleasa 3'→5'.

55 En la práctica de los métodos de la presente divulgación, la primera etapa consiste en producir una mezcla de extensión de cebador, p.ej. una composición que incluye todos los elementos necesarios para que tenga lugar la reacción de extensión de cebador. Por ejemplo, la mezcla de extensión de cebador puede incluir al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple, p.ej. de diferente Tf, que se hibridan entre sí en una solución libre para formar un par desactivado fluorescente que, tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible, teniendo por ejemplo una de las secuencias un Tf que está a la Th, o por debajo de ella, ("par cebador casete FET"), conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato.

60 Tiene lugar la FET cuando están en íntima proximidad un dador de energía fluorescente adecuado y una fracción de aceptor de energía. La energía de excitación absorbida por el dador se transfiere al aceptor que puede seguir disipando esta energía entonces ya sea por emisión fluorescente, si es un fluoróforo, o por medios no fluorescentes, si se trata de un desactivador. Un par dador-aceptor comprende dos fluoróforos que tienen espectros que se

solapan, solapándose la emisión del dador con la absorción del aceptor, de manera que existe una transferencia de energía desde el fluoróforo excitado al otro miembro del par. No es esencial que el fluoróforo excitado emita fluorescencia realmente, siendo suficiente que el fluoróforo excitado sea capaz de absorber eficazmente la energía de excitación y la transfiera eficazmente al fluoróforo emisor.

Como tales, el (los) casete(s) FET empleados en los métodos objeto de la invención son detectores de ácidos nucleicos que incluyen en oligonucleótidos por separado un dominio de fluoróforo, en el que está ubicado el dador de energía fluorescente, es decir el dador, y un segundo oligonucleótido con un dominio aceptor, en el que está ubicado el aceptor de energía fluorescente, es decir el aceptor. Tal como se ha mencionado anteriormente, el oligonucleótido dador incluye el fluoróforo dador. El fluoróforo dador puede estar ubicado en cualquier parte del detector de ácido nucleico, si bien está presente normalmente en el extremo 5' del detector.

El dominio aceptor incluye el aceptor de energía fluorescente. El aceptor puede estar ubicado en cualquier parte del dominio aceptor, si bien está presente normalmente en el extremo 3' del detector de ácido nucleico.

Además de los dominios de aceptor y fluoróforo, los oligonucleótidos del aceptor de casete FET también incluyen un dominio de unión de ácido nucleico diana que se une a una secuencia de ácido nucleico diana que se crea a partir de los cebadores de cola no marcados incluidos en la reacción, p.ej. en condiciones de hibridación rigurosas (tal como se define más adelante).

Dependiendo de la naturaleza del oligonucleótido y el propio ensayo, el dominio de unión diana puede hibridarse con la región del producto de extensión de cebador. Por ejemplo, cuando el ensayo es un ensayo de genotipificación de SNP, p.ej. en el que se emplea un sistema informador de casete universal, el dominio de unión diana se hibrida en condiciones rigurosas con el sitio de unión diana del producto de extensión de cebador. Los fluoróforos para los pares de oligonucleótido FET se pueden seleccionar para que sean de una familia química similar o diferente, tales como colorantes cianina, xantenos o similares. Los fluoróforos de interés incluyen sin limitarse sólo a ellos, colorantes de fluoresceína (p.ej. 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), y 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)), colorantes de cianina como Cy5, dansyl derivados, colorantes de rodamina (p.ej. tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), y tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX)), DABSYL, DABCYL, cianina, como Cy3, antraquinona, nitrotiazol y compuestos de nitroimidazol y similares. Los fluoróforos de interés se describen además en las solicitudes de patente internacionales WO 01/42505 y WO 01/86001.

Dado que la mezcla de reacción de extensión de cebador producida en la etapa inicial de los métodos objeto de la invención es una mezcla de reacción de extensión de cebador deficiente en exonucleasa 3'→5' incluye además una enzima que no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. En muchos modos de realización, la combinación de polimerasas empleada incluye al menos una Familia A, correspondiendo los términos "Familia A" y "Familia B" al esquema de clasificación notificado en Braithwaite & Ito, *Nucleic Acids Res.* (1993) 21:787-802. Las polimerasas de Familia A de interés incluyen: *Thermus aquaticus* polimerasas, incluyendo la polimerasa natural (Taq) y derivados y homólogos de la misma, como Klentaq (tal como se describe en *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1994) 91:2216-2220); *Thermus thermophilus* polimerasas, incluyendo la polimerasa natural (Tth) y derivados y homólogos de la misma, y similares. La polimerasa para su uso en la invención se puede utilizar en forma purificada o sin purificar.

Otro componente de la mezcla de reacción producido en la primera etapa de los métodos es el ácido nucleico molde. El ácido nucleico que sirve como molde puede ser de cadena simple o de doble cadena, siendo el ácido nucleico normalmente ácido desoxiribonucleico (ADN). La longitud del ácido nucleico molde puede ser de tan sólo 50 pb, si bien normalmente es de al menos aproximadamente 100 pb de longitud, más comúnmente al menos aproximadamente 150 pb de longitud, y puede tener una longitud de hasta 10.000 pb de longitud, p.ej. 50.000 pb de longitud o más, incluyendo un extracto de ADN genómico o un digesto del mismo, etc. El ácido nucleico puede estar libre en solución, flanqueado por uno o ambos lados con el ácido nucleico que no es el molde, presente en un vector, p.ej. plásmido y similar, siendo el único criterio que el ácido nucleico esté disponible para participar en la reacción de extensión de cebador. El ácido nucleico molde puede estar presente en forma purificada o formando complejo con otros ácidos nucleicos que no son molde, p.ej. en preparación de ADN celular, etc.

El ácido nucleico molde puede derivarse de diversas fuentes, dependiendo de la aplicación para la que se realice la PCR, incluyéndose entre dichas fuentes organismos que comprenden ácidos nucleicos, es decir, virus; procariontes, p.ej. bacterias, archaea y cianobacterias; y eucariotes, p.ej. miembros del reino protista, como flagelados, amebas y sus parientes, parásitos ameboides, ciliados y similares, miembros del reino de los hongos, como mohos mucilaginosos, mohos mucilaginosos acelulares, mohos mucilaginosos celulares, mohos acuáticos, mohos verdaderos, hongos conjugados, ascomicetos, hongos cavarioides, hongos imperfectos y similares; plantas como algas, musgos, hepáticas, anthocerophyta, lycopodiopsida, Equisetum, helechos, gimnospermas y plantas de flor, monocotiledóneas y dicotiledóneas; y animales, incluyendo esponjas, miembros de phylum cnidaria, p.ej. medusas, corales y similares, ctenóforos, gusanos, rotíferos, nematodos, anélidos, moluscos, artrópodos, equinodermos, gusanos bellota, y vertebrados, incluyendo reptiles, peces, aves, serpientes y mamíferos, p.ej. roedores, primates, incluyendo seres humanos y similares. El ácido nucleico molde puede utilizarse directamente desde su fuente natural y/o procesarse previamente de diversas formas, tal como se conoce en la técnica. En algunos modos de

realización, el ácido nucleico molde puede provenir de una fuente sintética.

El siguiente componente de la mezcla de reacción producida en la primera etapa de los métodos objeto de la invención está constituido por los cebadores empleados en la reacción de extensión de cebador, p.ej. los cebadores de PCR (tales como cebadores directos e inversos empleados en amplificación geométrica o un cebador único empleado en amplificación lineal). Cada mezcla de reacción de extensión de cebador comprenderá al menos dos cebadores (en caso de amplificación lineal) y, normalmente, tres cebadores, y más normalmente de cinco a siete cebadores en el caso de una reacción de genotipificación de SNP. Una mezcla de reacción de extensión de cebador comprenderá al menos un cebador dador marcado fluorescentemente y un aceptor complementario, un cebador marcado con desactivador en el caso de amplificación lineal, conteniendo uno o ambos cebadores al menos un grupo fosforotioato.

Más habitualmente, en el caso de amplificación exponencial, la mezcla de extensión de cebador comprenderá al menos un cebador dador marcado fluorescentemente y un aceptor complementario, un cebador marcado con desactivador y un cebador sin marcar inverso, conteniendo uno o cualquiera de los cebadores al menos un grupo fosforotioato. Lo más habitual es, en el caso de amplificación exponencial en la que se utiliza un sistema informador universal, que la mezcla de extensión de cebador comprenda al menos un cebador aceptor marcado fluorescentemente y un dador complementario, un cebador marcado con desactivador, un cebador sin marcar inverso y un cebador directo de cola, conteniendo uno o cualquiera de los cebadores al menos una modificación fosforotioato. Los cebadores de oligonucleótido con los que entra en contacto el ácido nucleico molde (en adelante denominado ADN molde para mayor facilidad) será suficientemente largo como para proporcionar hibridación con el ADN molde complementario en condiciones de hibridación (descritas con mayor detalle más adelante), pero no tendrá una longitud suficiente como para formar híbridos estables con el ADN molde en condiciones de polimerización. Los cebadores pueden tener una longitud de al menos 10 pb, p.ej. al menos 15 pb o 16 pb de longitud. Los cebadores pueden tener una longitud de 30 pb de longitud o más, por ejemplo, la longitud de los cebadores puede ser 18 a 60 pb de longitud, como por ejemplo de aproximadamente 20 a 35 pb de longitud. Se puede poner en contacto del ADN molde con un solo cebador o con un grupo de dos cebadores (cebadores directo e inverso), dependiendo de si se desea la extensión del cebador, amplificación lineal o exponencial del ADN molde. Cuando se emplea un único cebador, el cebador tendrá normalmente complementariedad con uno de los extremos 3' del ADN molde y cuando se emplean dos cebadores, los cebadores tendrán normalmente complementariedad con los dos extremos 3' del ADN molde de doble cadena.

Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico" significa ADN, ARN, tanto monocatenario como de doble cadena, así como cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, sin limitarse sólo a ellas, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan una carga adicional, polarizabilidad, unión de hidrógeno, interacción electrostática y funcionalidad al ácido nucleico. Dichas modificaciones incluyen, sin limitarse sólo a ellas, modificaciones con azúcar en la posición 2', modificaciones con pirimidina en la posición 5, modificaciones con purina en la posición 8, modificaciones con aminas exocíclicas, sustitución con 4-tiouridina, sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones en la cadena principal, metilaciones, combinaciones de apareamientos de bases inusuales, combinaciones como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', como protección con capuchón.

Tal como se utiliza en el presente documento "complementario" se refiere al par de bases de nitrógeno que consiste en una purina unida por enlaces de hidrógeno a pirimidina, que conecta las cadenas complementarias de ADN o de moléculas híbridas que unen ADN y ARN.

Tal como se utiliza en el presente documento "grupo fluorescente" se refiere a una molécula que al excitarse con luz con longitud de onda seleccionada, emite luz de una longitud de onda diferente. Grupos fluorescentes se puede referir también a "fluoróforos".

Tal como se utiliza en el presente documento "grupo de modificación de la fluorescencia" se refiere a una molécula que puede alterar en algún modo la emisión de fluorescencia desde un grupo fluorescente. Un grupo de modificación de fluorescencia lo lleva a cabo a través de un mecanismo de transferencia de energía. Dependiendo de la identidad del grupo de modificación de la fluorescencia, la emisión de fluorescencia puede sufrir una serie de alteraciones, incluyendo, pero sin limitarse sólo a ellas, atenuación, desactivación completa, potenciación, cambio de longitud de onda, cambio de polaridad, cambio en la duración de la fluorescencia. Un ejemplo de grupo de modificación de la fluorescencia es un grupo de desactivación.

Tal como se utiliza en el presente documento "transferencia de energía" se refiere al proceso según el cual se altera la emisión de fluorescencia de un grupo fluorescente a través de un grupo de modificación de fluorescencia. Si el grupo de modificación de fluorescencia es un grupo de desactivación, entonces la emisión de fluorescencia del grupo fluorescente se atenúa (desactiva). La transferencia de energía puede tener lugar por transferencia de energía de resonancia fluorescente, o por transferencia de energía directa. Los mecanismos exactos de transferencia de energía en estos dos casos son diferentes. Debe entenderse que cualquier referencia a la transferencia de energía en la presente solicitud abarca todos estos fenómenos con diferentes mecanismos. La transferencia de energía también se denomina en el presente documento transferencia de energía fluorescente o FET.

Tal como se utiliza en el presente documento "par de transferencia de energía" se refiere a dos moléculas cualquiera que participen en la transferencia de energía. Normalmente, una de las moléculas actúa como grupo fluorescente y la otra actúa como grupo de modificación de la fluorescencia. El par de transferencia de energía preferible de la presente invención comprende un grupo fluorescente y un grupo de desactivación. En algunos casos, la distinción entre el grupo fluorescente y el grupo de modificación de la fluorescencia puede ser borrosa. Por ejemplo, en determinadas circunstancias dos grupos fluoresceína adyacentes pueden desactivar entre sí la emisión fluorescente por transferencia de energía directa. Por esta razón, no hay ninguna limitación en cuanto a la identidad de cada uno de los miembros del par de transferencia de energía en la presente solicitud. Lo único que se necesita es que las propiedades espectroscópicas del par de transferencia de energía en conjunto cambien de una manera medible si se altera la distancia entre cada uno de los miembros en una cantidad crítica.

"Par de transferencia de energía" se utiliza para referirse a un grupo de moléculas que forman un complejo único dentro del cual tiene lugar la transferencia de energía. Dichos complejos pueden comprender por ejemplo dos grupos fluorescentes que pueden ser diferentes entre sí y un grupo de desactivación, dos grupos de desactivación y un grupo fluorescente o múltiples grupos fluorescentes y múltiples grupos de desactivación. En los casos en los que hay múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos de desactivación, los grupos individuales pueden ser diferentes entre sí.

Tal como se utiliza en el presente documento "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión de cebador que es complementario a la cadena de ácido nucleico (p.ej. en condiciones de hibridación rigurosas). El término "secuencia de oligonucleótidos" se puede utilizar en el presente documento para referirse a un cebador y viceversa.

Tal como se utiliza en el presente documento "grupo de desactivación" se refiere a un grupo de modificación de la fluorescencia que puede atenuar al menos parte de la luz emitida por un grupo fluorescente. Los autores de la invención se refieren a esta atenuación en el presente documento como "desactivación". Por lo tanto, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo de desactivación lleva a una señal de emisión que es menos intensa de lo esperado o que está ausente completamente. La desactivación tiene lugar a través de transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo de desactivación.

Tal como se utiliza en el presente documento "transferencia de energía de resonancia fluorescente" o "FRET" se refiere a un fenómeno de transferencia de energía en el que la luz emitida por el grupo fluorescente excitado es absorbida al menos parcialmente por un grupo de modificación de fluorescencia. Si el grupo de modificación de fluorescencia es un grupo de desactivación, entonces el grupo puede radiar la luz absorbida como luz de diferente longitud de onda o puede disiparla en forma de calor. FRET depende del solapamiento entre el espectro de emisión del grupo fluorescente y el espectro de absorción del grupo de desactivación. FRET también depende de la distancia entre el grupo de desactivación y el grupo fluorescente. Por encima de cierta distancia crítica, el grupo de desactivación no puede absorber la luz emitida por el grupo fluorescente o solamente de forma escasa.

Tal como se utiliza en el presente documento "cebador de cola" se refiere a un oligonucleótido que contiene dos dominios, uno específico para el ADN molde diana de interés y el otro, una secuencia única que sirve como molde para la producción del producto a partir de cebadores universales presentes en cada reacción de PCR distinta y diferente.

Tal como se utiliza en el presente documento "transferencia de energía directa" se refiere a un mecanismo de transferencia de energía en el que no tiene lugar el paso de fotones entre el grupo fluorescente y el grupo de modificación de fluorescencia. Sin vincularse a un mecanismo único, se cree que, en la transferencia de energía directa, el grupo fluorescente y el grupo de modificación de la fluorescencia interfieren con las estructuras electrónicas de uno y otro. Si el grupo de modificación de fluorescencia es un grupo de desactivación, esto tendrá como resultado que el grupo de desactivación impida que el grupo de fluorescencia emita luz.

En general, la desactivación por transferencia de energía directa es más eficaz que la desactivación por FRET. De hecho, algunos grupos de desactivación que no desactivan grupos de fluorescencia en particular por FRET (porque no tienen el necesario solapamiento de espectro con el grupo fluorescente) lo pueden hacer eficazmente por transferencia de energía directa. Asimismo, algunos de los grupos fluorescentes pueden actuar como grupos de desactivación por sí mismos si están lo suficientemente cerca de otros grupos fluorescentes como para causar la transferencia de energía directa. Por ejemplo, en estas condiciones, dos grupos de fluoresceína adyacentes pueden desactivar la fluorescencia uno a otro eficazmente. Por estas razones, no hay limitación en cuanto a la naturaleza de los grupos fluorescentes y los grupos de desactivación útiles para la puesta en práctica de la presente invención.

Un ejemplo de "condiciones de hibridación rigurosas" consiste en hibridación a 50 °C o más y 6.0*SSC (900 mM NaCl / 90 mM citrato sódico). Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas consiste en incubación durante toda la noche a 42°C o más en una solución de: 50 % formamida, 6*SSC (900 mM NaCl, 90 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato sódico (pH 7,6), 10 % sulfato de dextrano y 20 ug/ml de ADN de esperma de salmón esquilado, desnaturalizado. Condiciones de hibridación rigurosas son condiciones de hibridación que son al menos tan

rigurosas como las condiciones representativas mencionadas, considerándose las condiciones como al menos tan rigurosas cuando son en aproximadamente un 80 % tan rigurosas, normalmente, en al menos aproximadamente un 90 % tan rigurosas como las condiciones rigurosas específicas expuestas. Otras condiciones de hibridación rigurosas son conocidas en la técnica y se pueden emplear también.

5 Las referencias a secuencias que son idénticas en el presente documento se pueden interpretar como secuencias que son idénticas o sustancialmente homólogas entre sí.

Entre los ejemplos del uso de la presente invención se incluyen los siguientes:

10 Detección directa de productos de PCR

Este modo de realización, ilustrado en la FIG. 1 utiliza un cebador de oligonucleótido para iniciar el proceso de PCR. Se dirige dicho cebador convencional a la región de molde de interés y por tanto conduce la especificidad de la reacción. Dicho oligonucleótido está marcado también fluorescentemente en el extremo 5'. Existen distintos fluoróforos adecuados siendo una elección popular FAM (un derivado de fluoresceína). Finalmente, se incluye en la reacción un oligonucleótido marcado con desactivador 3' antisentido para el oligonucleótido marcado FAM. Existe una serie de marcadores adecuados, optándose por lo general por la serie de marcadores desactivadores Black Hole. Siempre y cuando la longitud del oligonucleótido desactivador sea lo suficientemente larga como para dar una Tf por encima de la Th de la reacción, se puede evaluar la generación de producto en cada ciclo del proceso de PCR en cualquier instrumento de PCR tiempo real (como por ejemplo ABI 7900 Prism Instrument). Alternativamente, se puede emplear en la reacción un oligonucleótido de desactivación que tenga una Tf por debajo de la Th de la reacción. Después de la PCR se enfría la reacción a temperatura ambiente y se pueden evaluar los productos en cualquiera de dichos instrumentos en tiempo real y además cualquier lector de placa fluorescente (como por ejemplo BMG Pherastar).

Gracias a la complementariedad de los dos oligonucleótidos marcados (desactivador y fluoróforo marcados), se hibridan entre sí. Esta hibridación acerca el marcador del desactivador muy próximo al fluoróforo produciendo así en conjunto una señal fluorescente de la molécula FAM desactivada, cuando se excita a 488 nm (la longitud de onda de excitación óptima de FAM).

Se incluyen también en la reacción un cebador inverso convencional para crear un par de cebador de PCR. El proceso PCR se inicia entonces y se empieza a generar el producto de PCR.

Después de los primeros ciclos de PCR se genera la secuencia antisentido del cebador fluorescente. Durante este proceso, el oligonucleótido de desactivador deja de unirse; esto produce el amplicón que contiene una molécula FAM 5'. Una vez que esto ocurre, el oligo de desactivación deja de tener capacidad de hibridarse con el oligonucleótido marcado con FAM, ya que el proceso de PCR produce un ADN de amplicón de doble cadena. Dado que el oligonucleótido de desactivación deja de poder hibridarse con el oligonucleótido FAM, se genera entonces una señal que es directamente proporcional a la cantidad de producto PCR generada.

40 Detección indirecta (tiempo real) de productos de PCR

Este modo de realización, ilustrado en la FIG.2, utiliza un oligonucleótido convencional (cebador) para iniciar el proceso de PCR. El cebador convencional tiene una cola con una secuencia de ADN que no va dirigida a la región de amplicón de interés, en virtud de lo cual esta cola es esencialmente inerte. Esta secuencia de cola está ubicada en la porción 5' del cebador. También se incluye en la reacción un oligonucleótido marcado fluorescentemente único que es idéntico o sustancialmente homólogo a la región de secuencia de cola del cebador convencional. Existe una serie de fluoróforos adecuados, optándose por lo general por FMA (un derivado de fluoresceína). Finalmente, se incluye en la reacción un oligonucleótido marcado con desactivador 3' antisentido para el oligonucleótido marcado con FAM. Existe una serie de marcadores adecuados, optándose por lo general por la serie de marcadores de desactivador Black Hole.

Siempre y cuando la longitud del oligonucleótido de desactivador sea lo suficientemente larga como para dar una Tf por encima de la Ta de la reacción, se puede evaluar la generación del producto en cada ciclo del proceso de PCR en cualquier instrumento de PCR en tiempo real (como por ejemplo, un ABI 7900 Prism instrument). Alternativamente, la reacción puede emplear un oligonucleótido de desactivación que tiene una Tf por debajo de la Th de la reacción. Tras la PCR se enfría la reacción a temperatura ambiente y se pueden evaluar los productos en cualquiera de dichos instrumentos en tiempo real, así como con un lector de placa fluorescente (como por ejemplo BMG Pherastar).

Gracias a la complementariedad de los dos oligonucleótidos marcados, se hibridan entre sí. Esta hibridación acerca el marcador del desactivador muy próximo al fluoróforo, produciendo así en conjunto una señal fluorescente desde la molécula FAM desactivada, cuando se excita a 488 nm (la longitud de onda de excitación óptima de FAM). A continuación, se inicia el proceso de PCR y se empieza a generar el producto de PCR. Después de los primeros ciclos de PCR se genera la secuencia antisentido del cebador fluorescente. El cebador de PCR fluorescente es

entonces capaz de iniciar la síntesis durante la PCR y así lo hace. Esto produce amplicón que contiene una molécula FAM 5'. Una vez que esto ocurre, el oligo de desactivación deja de ser capaz de hibridarse con el oligonucleótido marcado con FAM, ya que el proceso de PCR produce ADN de amplicón de doble cadena. Dado que el oligonucleótido de desactivación deja de poder hibridarse con el oligonucleótido FAM, se genera entonces una señal que es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado.

La región de cola del cebador de cola no tiene por qué ser idéntica al oligonucleótido marcado fluorescentemente único, siempre y cuando una secuencia antisentido de la región de cola generada se hibride con el oligonucleótido marcado fluorescentemente único.

Detección indirecta (punto final) de productos de PCR – Genotipificación de SNP

El modo de realización ilustrado en la FIG. 3 utiliza el mismo par de oligonucleótidos marcado con fluoróforo e desactivador que el descrito en la FIG. 2. El esquema de reacción es idéntico, salvo algunas modificaciones.

Para producir la genotipificación de SNP se requiere el uso de dos cebadores marcados fluorescentemente y que corresponden a los oligonucleótidos marcados con desactivador. Cada cebador tiene también en este caso una cola con una secuencia única, en la que se incluye, en la reacción, un cebador marcado fluorescentemente 5'. Dos colorantes adecuados son FAM y HEX, de resolución espectral entre sí. Los dos cebadores (porción sin cola; generalmente denominados directos) se dirigen al ADN de interés. En esta porción del cebador, difieren normalmente únicamente en un solo nucleótido en su base 3' terminal. Cada uno de los cebadores se dirige a la base polimórfica en el ADN de interés. Se lleva a cabo la PCR y los dos cebadores únicamente inician la síntesis cuando la base 3' está perfectamente apareada. Cuando se produce un desapareamiento, la síntesis no prosigue.

Durante la reacción, la cola específica dependiendo del genotipo es capaz de iniciar la síntesis (o ambos, en el caso de un heterocigoto). Esto vuelve a incorporar la porción de cola fluorescente del cebador en el producto de PCR impidiendo así la hibridación del oligonucleótido del desactivador. Se genera por tanto una señal según cuál de los oligonucleótidos ha iniciado la síntesis. A continuación, se lee la reacción en un lector de placa fluorescente para ambos fluoróforos. A continuación, se traza un gráfico de los datos resultantes y se genera un diagrama de racimo de un fluoróforo sobre otro. A continuación, se pueden determinar los genotipos resultantes basándose en los gráficos de racimo.

Otro uso más del sistema oligo par fluoróforo desactivador descrito es en la detección homogénea de productos de PCR con el uso de actividad nucleasa 5'-3' de Taq polimerasa.

La presente divulgación e invención se puede emplear para mejorar la especificidad y formación de cebador dímero que tiene lugar en el ensayo de 5' nucleasa, conocido también como taqman.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un" "uno" y "el" incluyen la referencia en plural a no ser que el contexto lo dicte claramente de otra forma. A no ser que se defina de otra forma, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado por el que los entienden habitualmente las personas especializadas en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviniente, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto lo dicte claramente de otra forma, entre el límite superior y el límite inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor interviniente o señalado en dicho intervalo indicado, queda abarcado en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en intervalos más pequeños y también quedan abarcados por la presente invención, sujetos a cualquier límite excluido de manera específica en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cada uno o ambos de dichos límites incluidos también se incluyen en la presente invención.

A continuación, se describirá la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos que tienen un fin únicamente ilustrativo sin pretenderse que limiten el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Abreviaturas:

FAM: 6-Carboxi Fluoresceína
 HEX: 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína
 Dabcyl : desactivador oscuro no fluorescente

Se diseñaron siete oligonucleótidos cuyas secuencias se pueden encontrar a continuación, en las que * representa uso de modificación S:

ES 2 620 750 T3

1) Oligonucleótido marcado con fluoresceína FAM Semi S: 5'-FAMG*CG*AT*TA*GC*CG*TT*AG*GA*TG*A3'

2) Oligonucleótido marcado fluorescentemente HEX Semi S: 5'-HEXG*TC*GG*TG*AA*CA*GG*TT*AG*AG*A3'

5 3) Desactivador FAM normal: 5' CCTAACGGCTAATCGC-3'Dabsyl

4) Desactivador HEX normal: 5' AACCTGTTCACCGAC-3'Dabsyl

10 5) Cebador 1 específico de alelo: 5' GCGATTAGCCGTTAGGATGACTGAGTGCAGGTTTCAGACGTCC3'

6) Cebador 2 específico de alelo: 5' GTCGGTGAACAGGTTAGAGACTGAGTGCAGGTTTCAGACGTCT3'

7) Cebador inverso común: 5' CTCCTTCCACCTCCGTACCAT3'

15 Se puede apreciar que en este ejemplo, el cebador de desactivador marcado con FAM tiene una secuencia de oligonucleótido de 16 meros y es más corta en más de 2 nucleótidos que la sonda cebador/informador marcada con FAM y, de manera similar, el cebador de desactivador marcado con HEX tiene una secuencia de oligonucleótidos de 15 meros y es más corta en más de 2 nucleótidos que la sonda cebador/informador marcada con HEX. Por consiguiente, las sondas cebador/informador marcadas con FAM HEX tienen una T_f que está a los 57 °C de la T_h de la etapa de hibridación del proceso de PCR, o por encima de ella, y se hibridará con el molde en el proceso, mientras que los cebadores de desactivador más cortos están por debajo de los 57 °C de la T_h de la etapa de hibridación, o por debajo de ella, y no se hibridarán con el molde.

25 Se diluyeron todos los oligonucleótidos a concentraciones iniciales de 200 μ M en 10 mM Tris/ HCl pH 8,0. Se llevaron todas las posteriores diluciones en este diluyente. Se creó una mezcla de ensayo que incluyó los siguientes componentes:

- 30 (1) 0,16 μ M cebador 1 específico de alelo
(2) 0,16 μ M cebador 2 específico de alelo
(3) 0,41 μ M cebador inverso (común)
(4) 0,1 μ M oligonucleótido marcado con FAM
(5) 0,1 μ M Oligonucleótido marcado con HEX
(6) 0,5 μ M oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido a oligonucleótido 4)
(7) 0,5 μ M oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido a oligonucleótido 5)
35 (8) 30-90 Unidades/ml Taq polimerasa N-terminal truncada
(9) 10 mM Tris / HCl pH 8,3
(10) 10 mM KCl
(11) 1,8 mM cloruro de magnesio
(12) 165,2 μ M dNTPs
40 (13) 212,5 nM 5-carboxi-X-rodamina, SE (5-ROX. SE)

45 Se añadieron a pocillos A1-B24 de una placa de microtitulación de 384 pocillos 10 ng de ADN genómico de 44 individuos caucásicos. Los 4 pocillos restantes se dejaron vacíos y sirvieron como pocillos de control negativo. A continuación, se secó la placa a 50 °C durante un periodo de 1 hora.

Se añadió a los pocillos A1-B24 de la placa secada 5 μ l de mezcla de ensayo y se selló la placa utilizando un sellador de placa de fusión transmisión diodo láser (KBioscience RU Ltd). A continuación, se sometió la placa a un ciclo térmico en las siguientes condiciones en un Hydrocycler (KBioscience RU Ltd):

- 50 94 °C durante 15 minutos activación de arranque en caliente
94 °C durante 20 segundos
61 - 55 °C durante 60 segundos (caída 0,8°C por ciclo)
10 ciclos en las condiciones indicadas
94 °C durante 20 segundos
55 °C durante 60 segundos
26 ciclos en las condiciones indicadas

60 Tras el ciclo térmico se determinó la fluorescencia asociada con cada pocillo utilizando un lector de placa BMG Pherastar. Se leyó cada pocillo tres veces en las siguientes combinaciones de longitud de onda.

Excitación FAM: 485 nm, Emisión FAM: 520 nm
Excitación HEX: 535 nm, Emisión HEX: 556 nm
Excitación ROX: 575 nm, Emisión ROX: 610 nm

65 A continuación, se trazó un gráfico con los datos resultantes como señal FAM dividida por ROX en el eje de las X y señal HEX dividida por ROX en el eje de las Y.

Tal como se puede observar del gráfico de dispersión de la FIG.4, son visibles tres grupos claramente discernibles asociados con los correspondientes genotipos lo que demuestra claramente la eficacia de la tecnología de detección.

5 **EJEMPLO 2**

10 Siguiendo un protocolo similar al descrito en el Ejemplo 1, se llevaron a cabo ensayos para comparar el uso de oligonucleótidos marcados fluorescentemente de configuraciones (i) no S modificadas, (ii) semi-S modificadas (fosforotioatos alternos) y (iii) completamente S-modificados. Los datos generados se presentan en la FIG. 5. Los datos presentados para el ensayo 1 demuestran el uso de las configuraciones (i), (ii) y (iii) (arriba); los datos para el ensayo 2 demuestran las configuraciones (i) y (ii). En ambos ensayos los oligonucleótidos de desactivador no tuvieron modificación con fosforotioato.

15 Se observó una mejor especificidad y una menor amplificación del control sin molde (véase abajo a la izquierda del gráfico de dispersión) con todas las variantes de los flúor modificados con fosforotioato. El uso de modificación con fosforotioato en todas las bases del oligonucleótido marcado fluorescentemente tuvo cierto efecto sobre la velocidad de PCR y la intensidad de señal. Se observó que el uso de modificación de fosforotioato en bases alternas de los cebadores marcados con flúor (denominada semi-modificación S) en combinación con desactivadores sin modificar fue óptimo para una mejor discriminación e intensidad de señal de la PCR.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5', comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente que, tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible cuando la secuencia complementaria se hibrida con una de las al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple, conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato;
- b) proporcionar al menos un cebador e iniciar la reacción de extensión de cebador a partir de al menos un cebador utilizando una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3' a 5' generando en virtud de ello una secuencia complementaria para al menos una de las secuencias de nucleótido de marcado simple; y
- c) medir la señal detectable que se genera cuando se hibrida la secuencia complementaria con una de las al menos dos secuencias de oligonucleótido de marcado simple.

2. Un kit para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5', que comprende:

- 1) al menos dos secuencias de oligonucleótidos de marcado simple, que se hibridan entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente que, tras la introducción de una secuencia complementaria para una o ambas secuencias genera una señal medible cuando se hibrida la secuencia complementaria con una de las dos secuencias de oligonucleótidos de marcado simple; y
 - 2) una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3' a 5';
- en el que al menos una de las secuencias de oligonucleótidos contiene al menos un grupo fosforotioato, en el que al menos una de las bases internas de la al menos una secuencia de oligonucleótidos contiene un grupo fosforotioato y en el que la al menos una secuencia de oligonucleótidos que contiene el al menos un grupo fosforotioato tiene del 20 al 80 %, opcionalmente, del 30 al 70 % de las bases modificadas por un grupo fosforotioato; y opcionalmente,

en el que las bases modificadas están separadas por al menos una base sin modificar y/o en el que fosforotioatos son bases alternas.

3. El método o el kit de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la primera y la segunda secuencias de oligonucleótidos son de diferente Tf (temperatura de fusión) y opcionalmente

- a) en donde una de entre la primera y la segunda secuencias de oligonucleótidos tiene una Tf que está a la Th (temperatura de hibridación) de la reacción de extensión de cebador, o por debajo de ella, o
- b) en donde una de entre la primera y la segunda secuencias de oligonucleótidos tiene una Tf que está a la Th de la reacción de extensión de cebador, o por encima de ella.

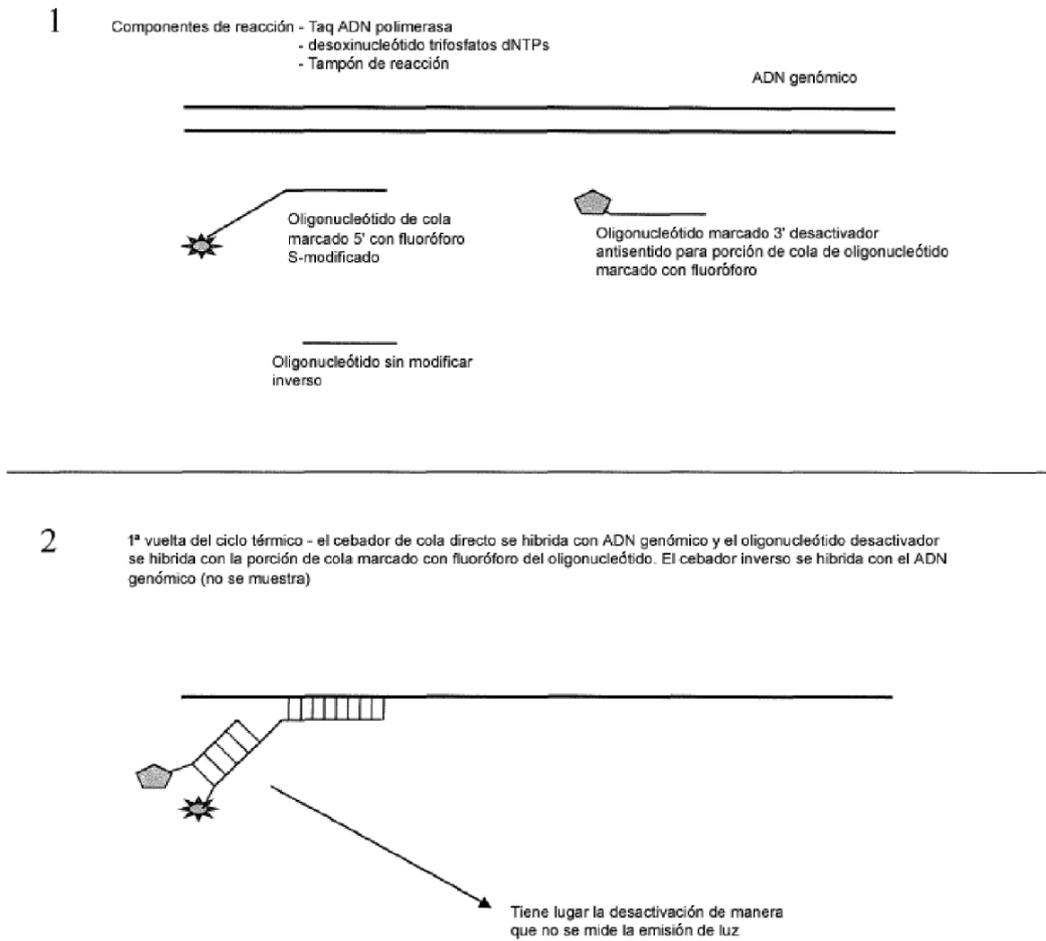
4. Un método para la detección de un producto de extensión de cebador producido en presencia de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'→5' utilizando PCR, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar una primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple y al menos una segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, teniendo una Tf diferente la primera y la segunda secuencias de oligonucleótidos, en las que se hibridan la primera y la segunda secuencias de oligonucleótidos entre sí en solución libre para formar un par desactivado fluorescente y al menos un cebador y teniendo una de entre la primera y la segunda secuencias de nucleótidos una Tf que está a la Th del proceso de PCR, o por debajo de ella, conteniendo al menos una de las secuencias de oligonucleótido al menos un grupo fosforotioato, comprendiendo el al menos un cebador al menos un cebador de cola sin marcar, teniendo el cebador de cola sin marcar una región de cola, comprendiendo la región de cola una secuencia de oligonucleótidos complementaria para una secuencia de oligonucleótidos de la segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, siendo la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple un cebador a partir del cual se inicia la síntesis de ADN una vez generada una secuencia complementaria para la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple durante el proceso de PCR, de manera que la segunda secuencia de oligonucleótidos de marcado simple deja de ser capaz de hibridarse con la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple, generando en virtud de ello una señal medible;
- b) iniciar la reacción de extensión de cebador a partir del al menos un cebador utilizando una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3' a 5' en virtud de lo cual se genera una secuencia complementaria para la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple; y
- c) medir la señal detectable que se genera cuando se hibrida la secuencia complementaria con la primera secuencia de oligonucleótidos de marcado simple.

5. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde uno de los oligonucleótidos de marcado simple es 10 bases más corto que el otro.

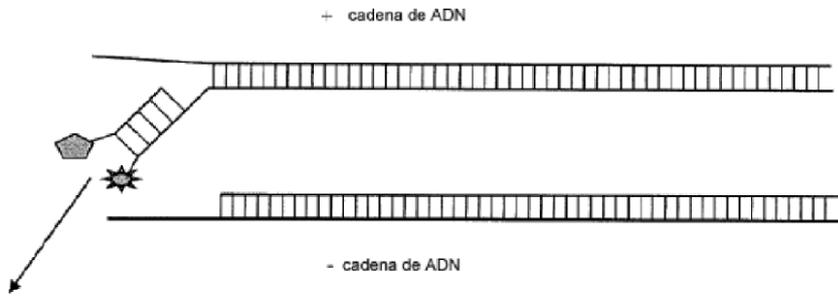
- 5 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 en el que el proceso de PCR se controla en tiempo real en cada ciclo o después de una serie de ciclos, cuando la reacción no haya generado todavía suficiente producto como para crear una señal medible, reduciendo la temperatura de la reacción para permitir que se produzca la hibridación.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dichos otros oligonucleótidos de marcado simple tienen una T_f que está por encima de la T_h.
- 10 8. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho nucleótido de marcado simple tiene el marcador desactivador del par desactivado fluorescente.
- 15 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8, en el que al menos una de las bases internas del (de los) oligonucleótido(s) que contiene(n) grupo fosforotioato es un fosforotioato y en el que el 20-80 %, opcionalmente el 30-70 %, de las bases del (de los) oligonucleótido(s) que contiene(n) grupo fosforotioato son fosforotioatos.
10. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en genotipificación de SNP basada en PCR específica de alelo.
- 20 11. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para controlar la producción de un amplicón mediante ensayo de 5'-nucleasa, en el que el ensayo 5' nucleasa se emplea para llevar a cabo reacciones de discriminación alélica.
- 25 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 11, en el que el producto de extensión de cebador se controla a través del uso de hibridación solamente, opcionalmente en el que el producto de extensión de cebador se controla a través del uso de hibridación solamente tras PCR.
- 30 13. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que los oligo pares de desactivación fluorescente están en el intervalo de 6 pb a 100 pb, opcionalmente en el intervalo de 6 pb a 100 pb, pero no coinciden en longitud.
14. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que al menos una de las bases de un oligonucleótido marcado con fluoróforo contiene al menos un grupo fosforotioato.
- 35 15. Un método o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los oligo pares de desactivación fluorescente están:
- 40 a) marcados, uno del par con un fluoróforo y el otro con una molécula de desactivación no fluorescente; y/o
b) modificados para ser resistentes a la degradación de nucleasa, y/o
- están marcados con moléculas que son sensibles a la distancia.

Figura 1. Detección directa de secuencia de ADN



3

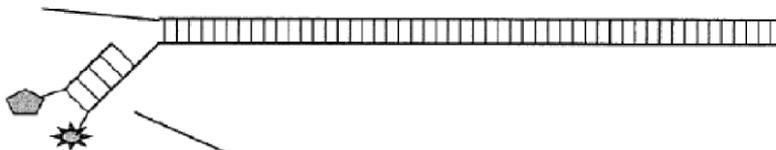
Tiene lugar la síntesis de ADN copiando ADN genómico que incorpora la secuencia de cola en la cadena sintetizada



Tiene lugar la desactivación, de manera que no se mide la emisión de luz

4

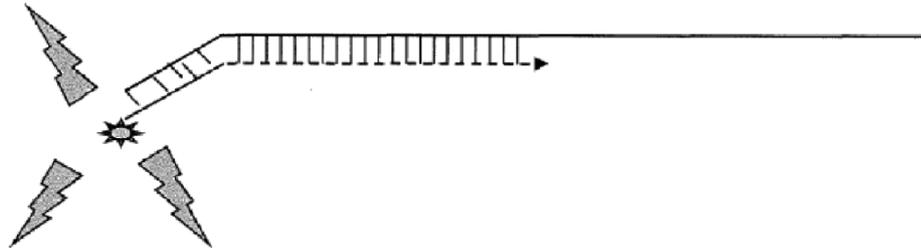
Se copia la cadena ADN sintetizada que incluye la cola de cebador. La cadena inversa también se ceba y copia desde cebador de más cola (no se muestra)



Tiene lugar la desactivación de manera que no se mide la emisión de luz

5

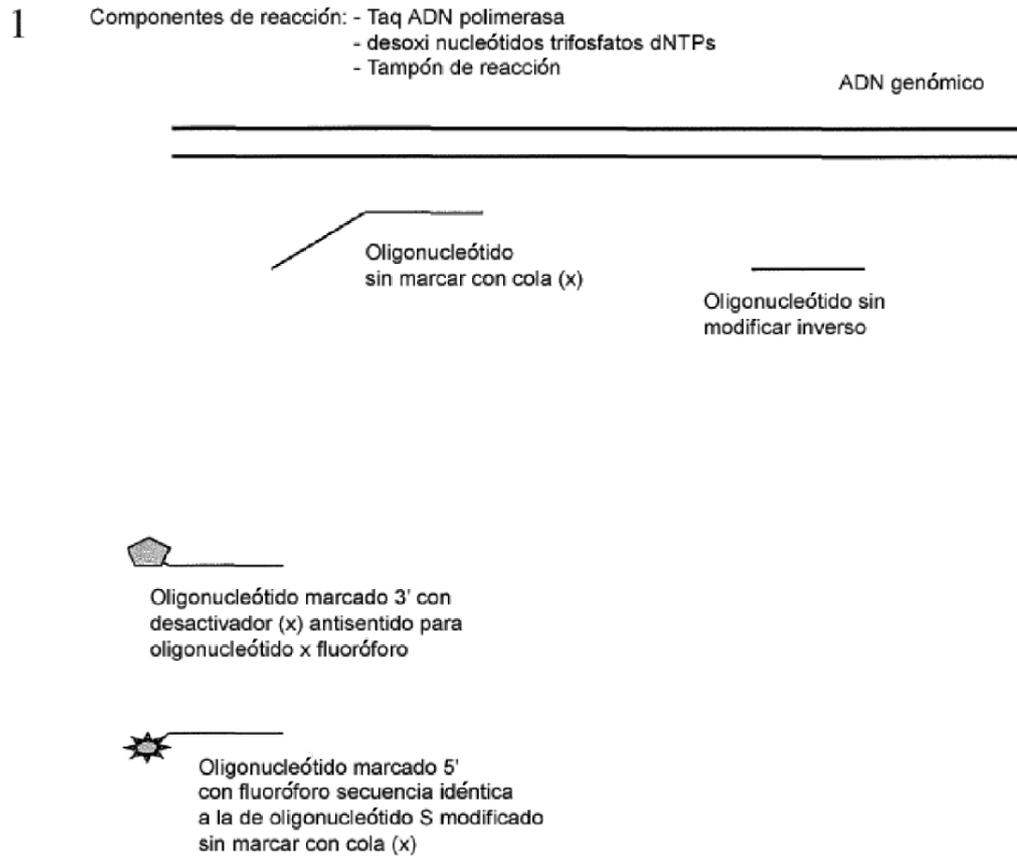
Se inicia la síntesis de ADN a partir del cebador marcado con fluorescente



El oligonucleótido ya no desactivado emite luz

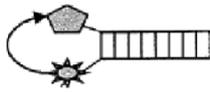
El oligonucleótido desactivador deja de ser capaz de hibridarse con el oligonucleótido marcado con fluorescente

Figura 2 - Detección indirecta (tiempo real) de secuencia de ADN



2

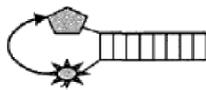
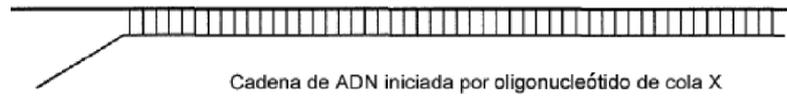
1ª vuelta de ciclo térmico - el cebador de cola directo se hibrida con el ADN genómico y el oligonucleótido desactivador se hibrida con su oligonucleótido marcado con fluoróforo complementario. El cebador inverso se hibrida con el ADN genómico (no se muestra)



Tiene lugar la desactivación de manera que no se mide la emisión de luz

3

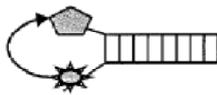
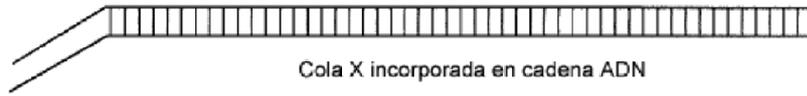
Tiene lugar la síntesis de ADN a partir del oligonucleótido que copia el ADN genómico incorporando la secuencia de cola x en la cadena sintetizada. No se muestra la cadena inversa



Tiene lugar la desactivación de manera que no se mide emisión de luz

4

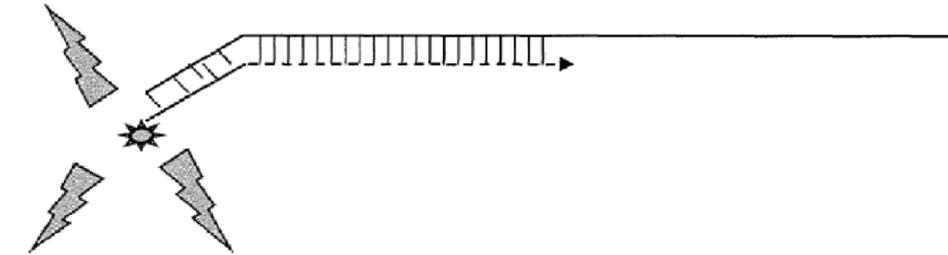
Se copia la cadena de ADN sintetizada incluyendo colas de cebador. La cadena inversa también se ceba y se copia a partir del cebador de cola (no se muestra)



Tiene lugar la desactivación de manera que no se mide emisión de luz

5

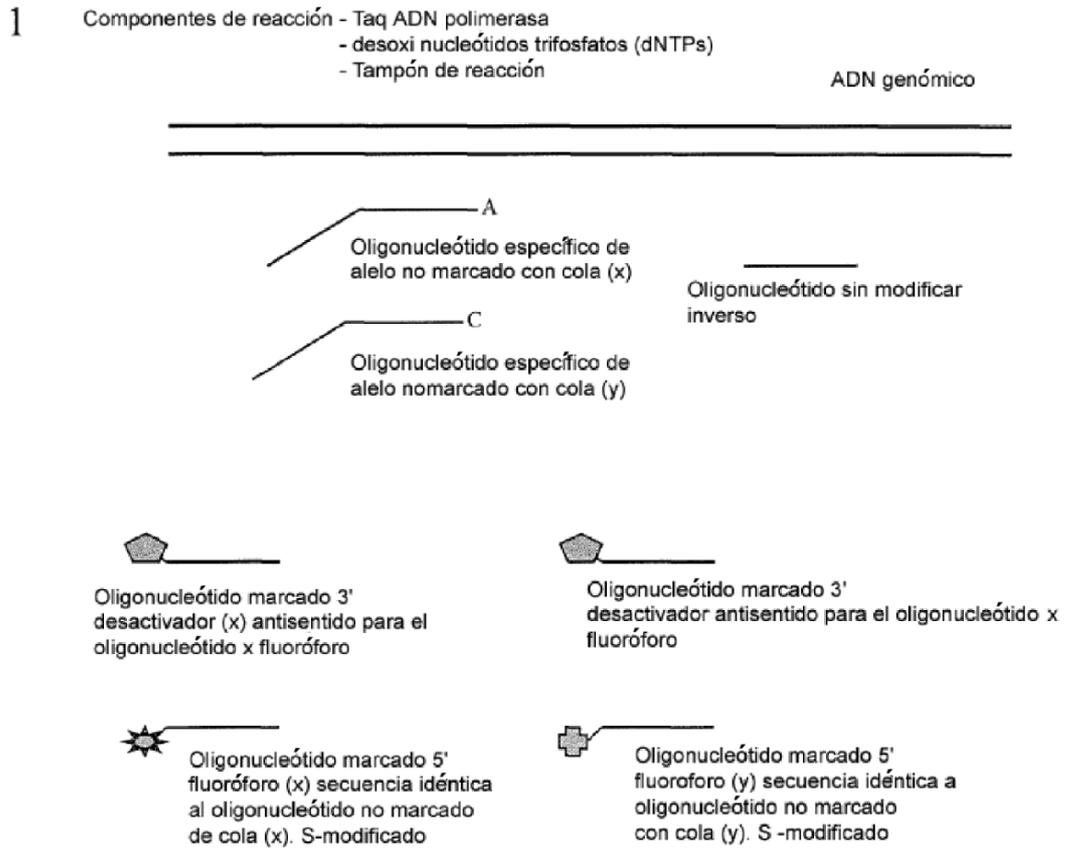
Se inicia la síntesis de ADN a partir de cebador ly-marcado x fluorescente



Oligonucleótido fluorescente ya no desactivado emite luz a una longitud de onda λ

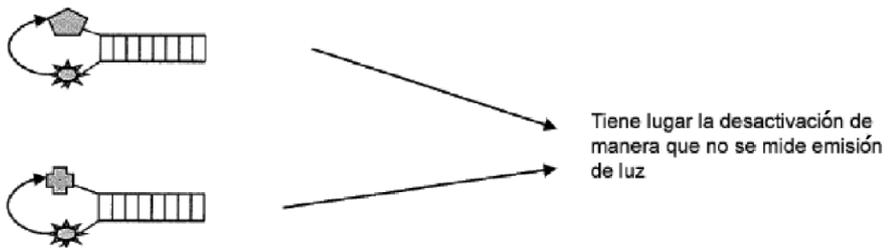
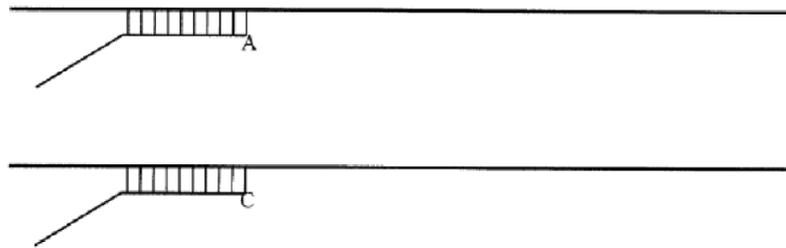
El oligonucleótido desactivador ya no es capaz de hibridarse con el oligonucleótido marcado con fluorescente

Figura 3 - Detección indirecta (punto final) de secuencia de ADN - Genotipificación SNP



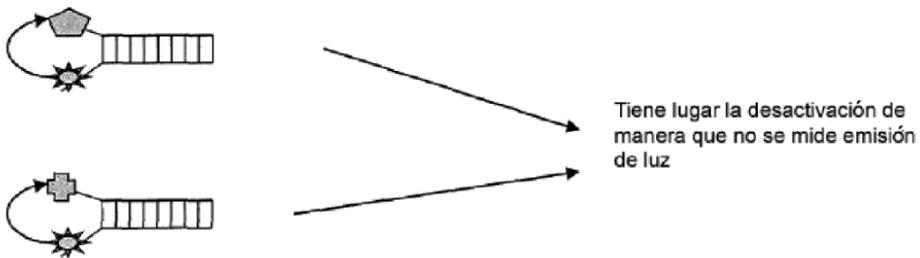
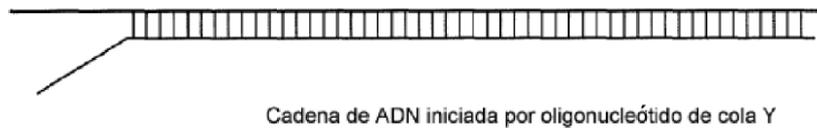
2

1ª vuelta de ciclo térmico - dependiendo del genotipo de ADN ensayado cada uno o ambos cebadores de cola directa se hibridan con el ADN genómico y los oligonucleótidos desactivadores se hibridan con sus oligonucleótidos marcados con fluoróforo complementarios. El cebador inverso se hibrida con el ADN genómico (no se muestra). En el ejemplo se muestra un individuo heterocigoto.



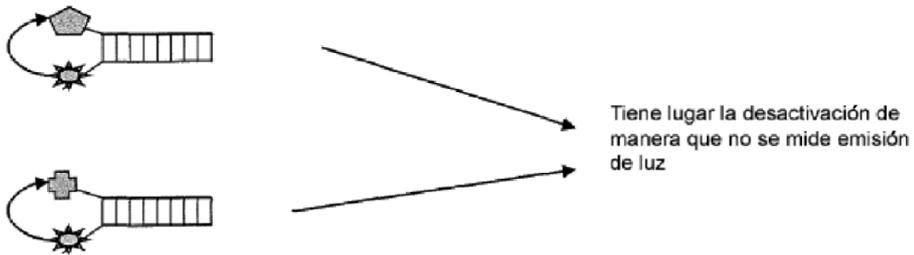
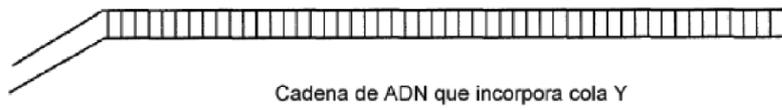
3

Tiene lugar la síntesis de ADN a partir de ambos oligonucleótidos específicos de alelo que copian el ADN genómico que incorpora las secuencias de cola x e y en las cadenas sintetizadas. No se muestra la cadena inversa.



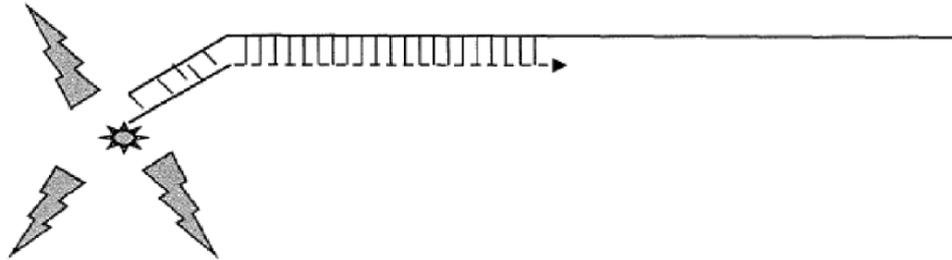
4

Se copia la cadena de ADN sintetizada que incluye colas de cebador. La cadena inversa también se ceba y se copia a partir de cebador específico de alelo con cola (no se muestra)



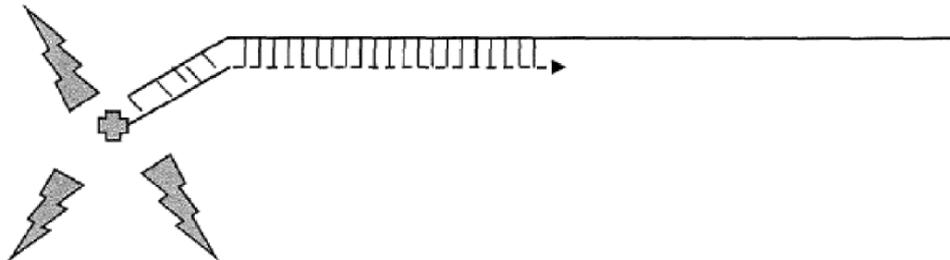
5

Se inicia la síntesis de ADN a partir de ambos cebadores marcados con fluorescente x e y



El oligonucleótido fluorescente ya no desactivado emite luz a una longitud de onda 1

El oligonucleótido desactivador deja de ser capaz de hibridarse con el oligonucleótido marcado con fluorescente



El oligonucleótido fluorescente ya no desactivado emite luz a una longitud de onda 2

El oligonucleótido desactivador deja de ser capaz de hibridarse con el oligonucleótido marcado con fluorescente

Figura 4

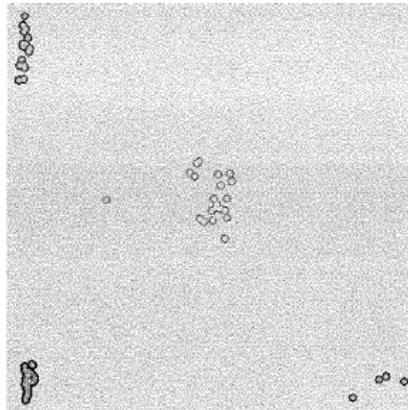
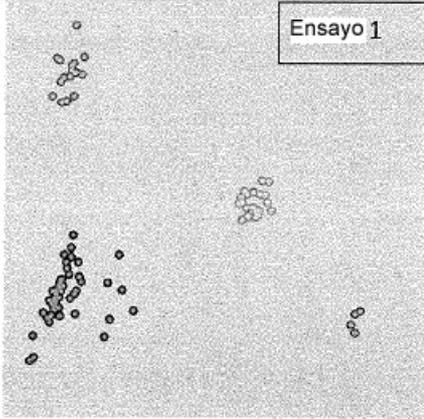
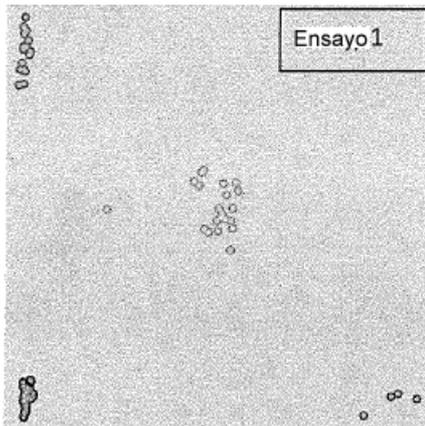


Figura 5 - Oligos fluorescentes modificados de forma diferente con desactivadores normales (no S modificados)

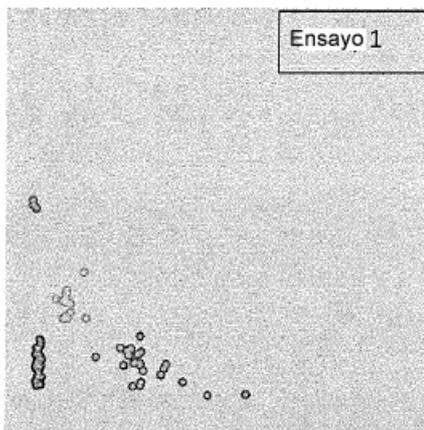
Cebadores marcados fluorescentemente normales (sin modificar con fosforotioato)



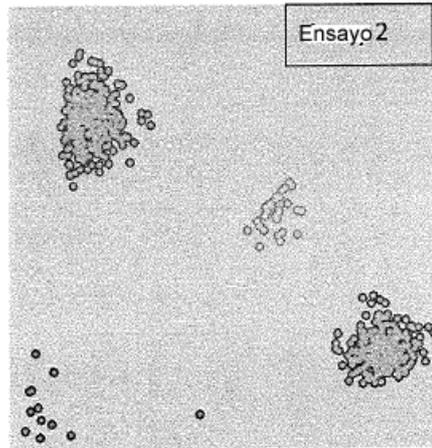
Cebadores marcados fluorescentemente modificados con fosforotioato Semi-S



Cebadores marcados fluorescentemente modificados con fosforotioato completamente S



Cebadores marcados fluorescentemente normales (sin modificar con fosforotioato)



Cebadores marcados fluorescentemente modificados con fosforotioato semi-S

