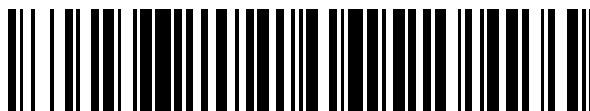


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 460**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2009 PCT/EP2009/006688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10031539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 09778549 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2347012**

54 Título: **Detección de variantes diana usando un marcador fluorescente y un extintor soluble**

30 Prioridad:

**18.09.2008 US 98186 P**

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

**09.08.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WILL, STEPHEN, GORDON;  
GUPTA, AMAR, P. y  
GEYER, LAURA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 629 460 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

Detección de variantes diana usando un marcador fluorescente y un extintor soluble

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos para detectar la presencia o ausencia de una variante del ácido nucleico diana a partir de una selección de posibles variantes.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desarrollo de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos 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. Los cebadores típicamente funcionan en pares que están diseñados para la extensión de uno hacia el otro para cubrir la región diana seleccionada. Un ciclo de PCR típico incluye una etapa de desnaturalización a alta temperatura (por ejemplo, 85 °C o más) durante la cual las hebras de ácidos nucleicos bicatenarios se separan una de otra, una etapa de renaturalización a baja temperatura (por ejemplo, 45 °C-65 °C) durante la cual los cebadores hibridan con las hebras individuales separadas y una etapa de extensión a temperatura intermedia (por ejemplo, alrededor de 72 °C) durante la cual una polimerasa del ácido nucleico extiende los cebadores. También se utilizan procedimientos de termociclado con dos temperaturas. Estos incluyen generalmente una etapa de desnaturalización a alta temperatura y una etapa de hibridación-extensión a baja temperatura.

Las PCR también se describen en muchas patentes estadounidenses diferentes, incluyendo, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.683.195, titulada «PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR-CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES», que fue concedida a Mullis et al. el 28 de Julio de 1987; la patente de EE. UU. N.º 4.683.202, titulada «PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES», que fue concedida a Mullis el 28 de julio de 1987; y la patente de EE. UU. N.º 4.965.188, titulada «PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES USING A THERMOSTABLE ENZYME», que fue concedida a Mullis et al. el 23 de Octubre de 1990. Además, también se describen técnicas relacionadas con la PCR en otras publicaciones diversas, tales como Innis et al. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Elsevier Science & Technology Books (1990), Innis et al. (Eds.) *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press (1999), Edwards et al., *Real-Time PCR*, Taylor & Francis, Inc. (2004) y Rapley et al., *Molecular Analysis and Genome Discovery*, John Wiley & Sons, Inc. (2004).

También se han desarrollado muchas variaciones de la PCR así como otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Ejemplos de estas incluyen PCR con transcripción inversa (RT-PCR) (Joyce (2002) «Quantitative RT-PCR. A review of current methodologies» *Methods Mol Biol.* 193:83-92 y Emrich et al (2002) «Quantitative detection of telomerase components by real-time, online RT-PCR analysis with the LightCycler», *Methods Mol Biol.* 191:99-108), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Lee (1996) «Ligase chain reaction», *Biologicals* 24 (3):197-9), la reacción en cadena de la polimerasa/ligasa (Barany et al. (1991) «The ligase chain reaction in a PCR world», *PCR Methods Appl.* 1(1):5-16), la Gap-LCR (Abravaya et al. (1995) «Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)», *Nucleic Acids Res.* 23(4):675-82), amplificación por desplazamiento de la hebra (Walker (1993) «Empirical aspects of strand displacement amplification», *PCR Methods Appl.* 3 (1):1-6), amplificación lineal ligada (LLA) (Killeen et al. (2003) «Linked linear amplification for simultaneous analysis of the two most common hemochromatosis mutations», *Clin Chem.* 49(7):1050-7), amplificación en círculo rodante (RCA) (Nilsson et al. (2002) «Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified molecular beacon design», *Nucleic Acids Res.* 30(14):e66), amplificación mediada por transcripción (TMA) (Emery et al. (2000) «Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya», *J Clin Microbiol* 38:2688-2695), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Mani et al. (1999) «Plasma RNA viral load as measured by the branched DNA and nucleic acid sequence-based amplification assays of HIV-1», *J Acquir Immune Defic Syndr* 22:208-209 y Berndt et al. (2000) «Comparison between a nucleic acid sequence-based amplification and branched DNA test for quantifying HIV RNA load in blood plasma», *J Virol Methods* 89:177-181), y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Mueller et al. (1997) «Self-sustained sequence replication (3SR): an alternative to PCR», *Histochem Cell Biol* 108:431-7).

Se han desarrollado diversas estrategias para detectar productos de amplificación, incluyendo aquellas que implican sondas nucleasa 5', balizas moleculares o cebadores SCORPION®, entre muchas otras. A título ilustrativo, un ensayo de nucleasa 5' utiliza típicamente la actividad nucleasa 5' a 3' de ciertas ADN-polimerasas para escindir las sondas nucleasa 5' durante el transcurso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos ensayos permiten tanto la amplificación de una diana como la liberación de marcadores para la detección, generalmente sin recurrir a múltiples etapas de manipulación de productos amplificados. Ciertas sondas nucleasa 5' incluyen restos marcadores, tales como un colorante indicador fluorescente y un colorante extintor. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador al colorante extintor da lugar, en general, a la supresión de la fluorescencia del indicador. En muchos casos, sin embargo, una sonda intacta produce cierta cantidad de fluorescencia residual o

basal. Durante una reacción con nucleasa 5', la escisión de la sonda separa el colorante indicador y el colorante extintor uno de otro, dando lugar a un aumento detectable de la fluorescencia del indicador. La acumulación de productos de la PCR o amplicones se detecta típicamente de forma indirecta monitorizando este incremento de la fluorescencia en tiempo real.

5 Se usan procedimientos de análisis de ADN basados en la temperatura de fusión para la detección de diferencias en la secuencia entre dos secuencias de ADN diferentes. Procedimientos para detectar la temperatura de fusión entre una sonda y una secuencia diana amplificada, no la temperatura de fusión del amplicón, se divulgan, por ejemplo, en los documentos WO 01/11078 y WO 02/097132. Se divulgan procedimientos de detección de variantes del ácido nucleico usando el análisis de la curva de fusión de una sonda que comprende un marcador junto con un extintor soluble en el documento EP 1 739 190; no hay, sin embargo, ninguna sugerencia ni indicación de que uno de los cebadores esté marcado o se use para la determinación de la Tm. Se describen procedimientos para identificar un ácido nucleico en el que se detectan múltiples señales de al menos dos colorantes fluorescentes diferentes, en el que uno de los colorantes está unido al polinucleótido específico utilizado y las otras funciones del colorante como un agente intercalante, en el documento US 2007/0172836. La tecnología descrita no se basa en ninguna interacción (FRET) entre el marcador unido y el agente de interacción.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

20 La presente invención proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de una variante del ácido nucleico diana en una muestra, en la que puede producirse un ácido nucleico diana en al menos dos variantes. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende

25 (a) proporcionar al menos un oligonucleótido marcado que comprende un primer marcador, comprendiendo dicho primer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, de tal manera que el oligonucleótido marcado hibrida con el ácido nucleico diana en una condición seleccionada;

30 (b) proporcionar al menos un modificador soluble de la emisión de luz, que, cuando el modificador se une de forma no covalente al ADN bicatenario que incorpora el oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del primer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del primer marcador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz cuando el oligonucleótido marcado es monocatenario;

35 (c) amplificar el ácido nucleico diana en la muestra en presencia del oligonucleótido marcado y del modificador soluble de la emisión de luz en una reacción de amplificación en la condición seleccionada, de tal manera que el oligonucleótido marcado se extienda para producir un primer amplicón marcado bicatenario (o si está presente más de una variante del molde, dos, tres o más amplicones marcados diferentes) que incorpore el oligonucleótido marcado, en el que el primer amplicón marcado bicatenario tenga una temperatura de fusión diferente dependiendo de cuál de las al menos dos variantes del ácido nucleico diana se amplifican;

40 (d) detectar la temperatura de fusión del amplicón marcado bicatenario disociado en dos hebras individuales monitorizando la señal del marcador con una temperatura cambiante; y

45 (e) correlacionar la temperatura de fusión del amplicón marcado bicatenario con la presencia de una de las al menos dos variantes diana, detectando de este modo la presencia o ausencia de una variante del ácido nucleico diana en una muestra.

En modos de realización preferentes de acuerdo con la presente invención, el procedimiento comprende además

50 proporcionar un segundo oligonucleótido marcado que comprende un segundo marcador, comprendiendo dicho segundo marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del segundo oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una segunda subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el segundo oligonucleótido marcado hibrida con el segundo ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal del segundo marcador puede distinguirse de la señal del primer marcador,

55 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el segundo oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del segundo marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del segundo marcador cuando el segundo oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz;

60 en el que la muestra comprende al menos una (y opcionalmente dos, tres o más) variante(s) del ácido nucleico diana y la etapa de amplificación (c) comprende además amplificar el ácido nucleico en la muestra en presencia del segundo oligonucleótido marcado en la reacción de amplificación, de manera que el segundo oligonucleótido marcado se extienda para producir un segundo amplicón marcado (o si está presente más de una variante del molde, dos, tres o más amplicones marcados diferentes) que incorpore el segundo oligonucleótido marcado, y en el

que el segundo amplicón marcado tenga una temperatura de fusión diferente dependiendo de cuál de las al menos dos variantes del ácido nucleico diana se amplifiquen;

5 en el que la etapa de detección (d) comprende además detectar la temperatura de fusión del segundo amplicón marcado monitorizando la señal del segundo marcador con una temperatura cambiante; y

en el que la etapa de correlación (e) comprende además correlacionar la temperatura de fusión del segundo amplicón marcado con la presencia de una segunda variante del ácido nucleico diana.

10 En modos de realización preferentes adicionales de acuerdo con la invención, el procedimiento comprende además proporcionar un tercer oligonucleótido marcado que comprende un tercer marcador, comprendiendo dicho tercer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del tercer oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una tercera subsecuencia del ácido nucleico diana que  
15 puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el tercer oligonucleótido marcado hibrida con el tercer ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal de tercer marcador puede distinguirse de la señal del primer y segundo marcador,

20 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el tercer oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del tercer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del tercer marcador cuando el tercer oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz;

25 en el que la muestra comprende al menos una (y opcionalmente dos, tres o más) variante(s) del ácido nucleico diana y la etapa de amplificación (c) comprende además amplificar el ácido nucleico en la muestra en presencia del tercer oligonucleótido marcado en la reacción de amplificación, de manera que el tercer oligonucleótido marcado se extienda para producir un tercer amplicón marcado (o si está presente más de una variante del molde, dos, tres o más amplicones marcados diferentes) que incorpore el tercer oligonucleótido marcado, y en el que el tercer amplicón marcado tenga una temperatura de fusión diferente dependiendo de cuál de las al menos dos variantes del  
30 ácido nucleico diana se amplifiquen;

en el que la etapa de detección (d) comprende además detectar la temperatura de fusión del tercer amplicón marcado monitorizando la señal del tercer marcador con una temperatura cambiante; y

35 en el que la etapa de correlación (e) comprende además correlacionar la temperatura de fusión del tercer amplicón marcado con la presencia de una tercera variante del ácido nucleico diana.

Es preferente de acuerdo con la invención que el segundo amplicón marcado comprenda diferentes secuencias variantes del ácido nucleico diana en comparación con el primer amplicón marcado.

40 En modos de realización preferentes adicionales, el modificador es un colorante de diazina o un colorante de tiazina.

45 En otros modos de realización preferentes, el modificador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de azocarmina, un colorante de fenazina, un colorante de oxazina, cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina, azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, sim-dimetiltionina, azul de toluidina O, nuevo azul de metileno, violeta de metileno bernthsen, azul A, azul B y azul C.

En algunos modos de realización preferentes, el primer marcador comprende un colorante fluorescente.

50 En algunos modos de realización preferentes, el primer marcador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína y un colorante de cianina.

En algunos modos de realización preferentes, el segundo marcador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína y un colorante de cianina.

55 En algunos modos de realización preferentes, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de un patógeno, un ser humano, un animal, un oncogén o bacteriano.

En algunos modos de realización preferentes, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.

60 En algunos modos de realización preferentes, las temperaturas de fusión de los amplicones de las al menos dos variantes difieren en al menos 5 grados C.

65 La presente invención se relaciona además con una mezcla de reacción como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende:

un ácido nucleico diana;

5 al menos un oligonucleótido marcado que comprende un primer marcador, comprendiendo dicho primer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, de tal manera que el oligonucleótido marcado hibrida con el ácido nucleico diana en una condición seleccionada;

10 al menos un modificador soluble de la emisión de luz, que, cuando el modificador se une al ADN bicatenario que incorpora el oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del primer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del primer marcador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz cuando el oligonucleótido marcado es monocatenario;

en el que todos los oligonucleótidos de menos de 100 nucleótidos de longitud están marcados.

15 La presente invención también está relacionada con mezclas de reacción que comprenden:

un ácido nucleico diana;

20 al menos un oligonucleótido marcado que comprende un primer marcador, comprendiendo dicho primer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, de tal manera que el oligonucleótido marcado hibrida con el ácido nucleico diana en una condición seleccionada;

25 al menos un modificador soluble de la emisión de luz, que, cuando el modificador se une al ADN bicatenario que incorpora el oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del primer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del primer marcador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz cuando el oligonucleótido marcado es monocatenario; y

30 un segundo polinucleótido del amplicón de mono o bicatenario (o si está presente más de una variante del molde, dos, tres o más amplicones marcados diferentes), en el que el primer polinucleótido del amplicón comprende el marcador y la secuencia del oligonucleótido marcado.

En algunos modos de realización, todos los oligonucleótidos están marcados.

35 En algunos modos de realización, el primer marcador comprende un colorante fluorescente.

En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende además uno o más de: un tampón, una sal, un ion metálico, un nucleótido que incorpora un biocatalizador o un desoxinucleótido.

40 En algunos modos de realización, el modificador es un colorante de diazina o un colorante de tiazina.

45 En algunos modos de realización, el modificador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de azocarmina, un colorante de fenazina, un colorante de oxazina, cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina, azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, sim-dimetiltionina, azul de toluidina O, nuevo azul de metileno, violeta de metileno bernthsen, azul A, azul B y azul C.

En algunos modos de realización, el primer marcador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína y un colorante de cianina.

50 En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de un patógeno.

En algunos modos de realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.

55 En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende además

60 un segundo oligonucleótido marcado que comprende un segundo marcador, comprendiendo dicho segundo marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del segundo oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una segunda subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el segundo oligonucleótido marcado hibrida con el segundo ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal del segundo marcador puede distinguirse de la señal del primer marcador,

65 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el segundo oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del segundo marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del segundo marcador cuando el segundo oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz.

En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende además

un segundo oligonucleótido marcado que comprende un segundo marcador, comprendiendo dicho segundo marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del segundo oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una segunda subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el segundo oligonucleótido marcado hibrida con el segundo ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal del segundo marcador puede distinguirse de la señal del primer marcador,

en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el segundo oligonucleótido marcado altera la emisión de luz del segundo marcador comparado con la emisión de luz del segundo marcador cuando el segundo oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz; y

un segundo polinucleótido del amplicón de mono o bicatenario (o si está presente más de una variante del molde, dos, tres o más amplicones marcados diferentes), en el que el primer polinucleótido del amplicón comprende el marcador y la secuencia del segundo oligonucleótido marcado.

Se apreciará que también puede estar presente un tercer, cuarto, quinto, etc. oligonucleótido marcado/amplicón marcado dependiendo del número de oligonucleótidos marcados requeridos o deseados y dependiendo de la presencia o ausencia del molde apropiado.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 ilustra las curvas de fusión de los amplicones generados usando cebadores HPV16 en un molde HPV16, cebadores HPV45 en un molde HPV45 o mezclas de ambos conjuntos de cebadores y moldes.

La figura 2 ilustra las curvas de fusión de los amplicones generados usando cebadores HPV31 en un molde HPV31, cebadores HPV39 en un molde HPV39 o mezclas de ambos conjuntos de cebadores y moldes.

#### DEFINICIONES

«Amplicón» se refiere a una molécula hecha amplificando una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como ocurre en una reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como una reacción en cadena de polimerasa («PCR»), una amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR) u otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos. Típicamente, un amplicón es una copia de un ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, un molde o ácido nucleico diana), una parte de la misma (por ejemplo, al menos 50, 100, 200, 500, 1000 pares de bases o más de un ácido nucleico diana) o es complementaria de la misma.

«Reacción de amplificación» se refiere a una reacción que implica la replicación de una o más secuencias de ácido nucleico diana o complementos de la misma. Ejemplos de reacciones de amplificación incluyen PCR, reacciones en cadena de la ligasa (LCR), entre muchas otras.

Un «complemento» de un ácido nucleico se refiere a un segmento de ácido nucleico que puede combinarse en una asociación antiparalela o hibridar con al menos una subsecuencia de dicho ácido nucleico, por ejemplo como «pares de bases de Watson-Crick». La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo, en forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como cuando dos o más ácidos nucleicos monocatenarios hidridizan entre sí. Algunas bases que no se encuentran comúnmente en ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos a los que se hace referencia en el presente documento e incluyen, por ejemplo, inosina, 7-desazaguanina y las que se analizan a continuación. La complementariedad no necesita ser perfecta; dúplex estables de polinucleótidos, por ejemplo, pueden contener pares de bases con emparejamientos erróneos o bases no emparejadas de manera que existan regiones complementarias y no complementarias.

Los expertos en la técnica de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad de los dúplex considerando empíricamente una serie de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud de una región de complementariedad, la composición de las bases y la secuencia de nucleótidos en una región de complementariedad, fuerza iónica y la incidencia de pares de bases con emparejamientos erróneos.

«Colorante de diazina» se refiere a cualquiera de una clase de compuestos químicos orgánicos que contienen un anillo de benceno en el que dos de los átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de nitrógeno. Los ejemplos de colorantes de diazina incluyen un colorante de azocarmina, un colorante de fenazina, un colorante de oxazina y cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina (Janus Verde B o Diazina Verde 5).

Los ácidos nucleicos «hibridan» cuando hebras simples complementarias de ácido nucleico se emparejan para dar una secuencia de ácido nucleico bicatenario. La hibridación se produce debido a una variedad de fuerzas bien caracterizadas, incluyendo los puentes de hidrógeno, la exclusión del disolvente y el apilamiento de bases. Se puede encontrar una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays», Elsevier (1993).

«Marcador» o «resto marcador» se refiere a un resto unido (covalente o no covalentemente), o capaz de unirse, a una molécula, de manera que dicho resto proporciona o es capaz de proporcionar información sobre la molécula (por ejemplo, información descriptiva, identificativa, etc. sobre la molécula) u otra molécula con la que interactúa la molécula marcada (por ejemplo, hibrida, etc.). Los ejemplos de marcadores incluyen marcadores fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, extintores o absorbentes), marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radioactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.) y similares. A título ilustrativo adicional, los marcadores fluorescentes pueden incluir colorantes que estén cargados negativamente, tales como colorantes de la familia de la fluoresceína, o colorantes que son de carga neutra, tales como colorantes de la familia de la rodamina, o colorantes que estén cargados positivamente, tales como colorantes de la familia de la cianina. Los colorantes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los colorantes de la familia de la rodamina incluyen, por ejemplo, Texas Red, ROX, R1 10, R6G y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R1 10, R6G y TAMRA están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, Mass., EE. UU.) y Texas Red está disponible comercialmente, por ejemplo, en Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.). Los colorantes de la familia de la cianina incluyen, por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, N.J., EE. UU.). Se hace referencia a marcadores adicionales en el presente documento o se conocen en la técnica.

«Modificador de la emisión de luz» se refiere a una sustancia que se asocia no covalentemente (por ejemplo, se une no covalentemente, por ejemplo a la ranura menor o mayor, se intercala, se adsorbe, etc.) con un ácido nucleico en una mezcla y que cambia la emisión detectable de radiación de una fuente de radiación (por ejemplo, un resto fluorescente) asociada con el ácido nucleico cuando la sustancia está proximal a la fuente de radiación. En algunos modos de realización, por ejemplo, ciertos modificadores de la emisión de luz descritos en el presente documento reducen o extinguen la emisión de luz que de otro modo se emitiría (por ejemplo, una emisión de luz basal) a partir de oligonucleótidos que incluyen al menos un resto emisor de luz (por ejemplo, cebadores) cuando los modificadores de la emisión de luz se ponen en contacto con dichos oligonucleótidos. Los modificadores de la emisión de luz son típicamente solubles y en estos modos de realización también se denominan «extintores solubles» o «modificadores solubles de la emisión de luz ». Además, sin estar limitado por ninguna teoría en particular, se cree que un modificador de la emisión de luz se une generalmente a los ácidos nucleicos de una manera dependiente de la longitud y se une mucho más fuertemente a los ácidos nucleicos bicatenarios en comparación con los ácidos nucleicos monocatenarios. Es decir, los modificadores de la emisión de luz típicamente se unen a ácidos nucleicos más largos en mayor grado que a ácidos nucleicos relativamente más cortos. Por consiguiente, el grado en el que un modificador de la emisión de luz modifica la emisión de luz desde un ácido nucleico marcado dado dependerá de si el ácido nucleico marcado es mono o bicatenario. Los ejemplos de modificadores de la emisión de luz incluyen diversos colorantes de diazina y tiazina, que se describen adicionalmente en el presente documento.

«Resto marcador que emite luz» se refiere a un resto marcador que genera o es capaz de generar radiación o luz detectable. Ciertos restos marcadores que emiten luz generan luz, por ejemplo, por fluorescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia o similares.

«Mezcla» se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. «Mezcla de reacción» se refiere a una mezcla que comprende moléculas que pueden intervenir en una reacción dada y/o facilitarla. A título ilustrativo, una mezcla de reacción de amplificación incluye, en general, una solución que contiene reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, y contiene típicamente cebadores, una polimerasa de ácidos nucleicos, dNTP y un catión metálico divalente en un tampón adecuado. Una mezcla de reacción se denomina «completa» si contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, e «incompleta» si contiene solo un subconjunto de los reactivos necesarios. Un experto en la técnica entenderá que los componentes de la reacción se almacenan de forma rutinaria como soluciones separadas, conteniendo cada uno un subconjunto de los componentes totales, por razones de comodidad, estabilidad de almacenamiento o para permitir un ajuste de las concentraciones de componentes dependiente de la aplicación, y que los componentes de la reacción se combinan antes de la reacción para crear una mezcla de reacción completa. Los componentes de la reacción también pueden formularse en forma seca, por ejemplo, comprimidos, y después pueden reconstituirse antes de su uso.

«Resto» o «grupo» se refiere a una de las partes en las que se divide algo, tal como una molécula (por ejemplo, un grupo funcional, un grupo sustituyente o similar). Por ejemplo, una sonda puede considerarse un oligonucleótido que opcionalmente comprende un resto extintor, un resto marcador o similar.

El término «ácido nucleico» se refiere a un polímero de monómeros que se puede corresponder con un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o de ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como sus formas modificadas, ácidos peptidonucleicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA™) y similares. En ciertas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómeros, por ejemplo, subunidades tanto de ARN como de ADN. Un ácido nucleico puede ser o incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desproteínizado, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

Un ácido nucleico es típicamente monocatenario o bicatenario y, en general, contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se indica en este documento, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925 y las referencias en el mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; y Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26:1419), fosforoditioato (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437 y la patente de EE. UU. N.º 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), enlaces de O-metilfosforoamidita (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y cadenas principales y enlaces de ácidos peptidonucleicos (Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; y Carlsson et al. 1996, *Nature*, 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales cargadas positivamente (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097); cadenas principales no iónicas (patentes de EE. UU. N.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30:423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, «Carbohydrate Modifications in Antisense Research», Ed. YS Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395; Jeffs et al. (1994) *L Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE. UU. N.º 5.235.033 y 5.034.506 y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al. (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen también en, por ejemplo, Rawls, *C & E News* 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden hacerse para facilitar la adición de restos adicionales tales como restos marcadores, o para alterar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácidos nucleicos también incluyen los que tienen bases heterocíclicas no naturales u otras bases modificadas, muchas de las cuales se describen o se hace referencia a ellas de otro modo en el presente documento. En particular, muchas bases no naturales se describen además en, por ejemplo, Seela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, and Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. A título ilustrativo adicional, se incluyen opcionalmente ciertas bases utilizadas en nucleótidos que 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 patente de EE. UU. N.º 5.990.303, titulada «SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES», que fue concedida el 23 de noviembre de 1999 a Seela. 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-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluouracilo; 5-clouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

Ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados también se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5.484.908, titulada «OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL PYRIMIDINES», concedida el 16 de enero de 1996 a Froehler et al., la patente de EE. UU. N.º 5.645.985, titulada «ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION WITH OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES», concedida el 8 de julio de 1997 a Froehler et al., la patente de EE. UU. N.º 5.830.653, titulada «METHODS OF USING OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES», concedida el 3 de noviembre de 1998 a Froehler et al., la patente de EE. UU. N.º 6.639.059, titulada «SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES», concedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine et al., la patente de EE. UU. N.º 6.303.315, titulada «ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES», concedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2003/0092905, titulada «SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES» de Kochkine et al. que se publicó el 15 de mayo de 2003.



«Biocatalizador que incorpora nucleótidos» se refiere a un catalizador que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los biocatalizadores que incorporan nucleótidos son típicamente enzimas. Una «enzima» es un catalizador basado en proteínas que actúa para reducir la energía de activación de una reacción química que implica otros compuestos o «sustratos». «Enzima que incorpora nucleótidos» se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los ejemplos de enzimas que incorporan nucleótidos incluyen, por ejemplo, ADN-polimerasas, ARN-polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido-fosforilasas y similares. Otros biocatalizadores pueden estar basados en ADN («ADNzimas») o basados en ARN («ribozimas»). «Enzima termoestable» se refiere a una enzima que es estable al calor, es resistente al calor y retiene suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable retiene suficiente actividad para efectuar reacciones subsiguientes de extensión del cebador cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica, y se ejemplifican en la patente de EE. UU. N.º 4.683.202, titulada «PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES», concedida el 28 de julio de 1987 a Mullis y la patente de EE. UU. N.º 4.683.195, titulada «PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR-CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES», concedida el 28 de julio de 1987 a Mullis et al. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es típicamente adecuada para su uso en una reacción con ciclos de temperatura, tal como una PCR o una reacción de la nucleasa 5'. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la polimerización de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión del cebador que sean complementarios a un ácido nucleico molde.

«Oligonucleótido» o «Polinucleótido» se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos), típicamente más de tres unidades monoméricas y más típicamente más de diez unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido, en general, depende de diversos factores, incluyendo el uso o función final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero no limitado a, aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación del ADN, transcripción inversa, clonación y digestión con enzimas de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa mediante un procedimiento tal como el procedimiento del fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:90-99; el procedimiento del fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109-151; el procedimiento de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; el procedimiento del triéster de Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191; procedimientos de síntesis automatizados; o el procedimiento en un soporte sólido de la patente de EE. UU. N.º 4.458.066, titulada «PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES», concedida el 3 de julio de 1984 a Caruthers et al., u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Un colorante de tiazina se refiere a cualquiera de una clase de compuestos químicos orgánicos que contienen un sistema de anillos condensados aromáticos tricíclicos, en el que dos de los carbonos en el anillo central están reemplazados por un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre. Los ejemplos de colorantes de tiazina incluyen azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, azul de simidimetiltionina, azul de toluidina O, nuevo azul de metileno, violeta de metileno bernthsen, azul A, azul B y azul C.

El término «ácido nucleico molde» o «ácido nucleico diana» se refiere a un ácido nucleico que se ha de amplificar, detectar o analizar de otro modo. Las «variantes del ácido nucleico diana» son secuencias de ácido nucleico que se sabe que se producen, o se cree que posiblemente se producen en una muestra, y que son similares o casi idénticas a la secuencia de ácido nucleico diana o una respecto a otra excepto por un número relativamente pequeño de cambios en nucleótidos. Los cambios pueden producirse como una inserción o delección, o pueden ser mutaciones puntuales. Como un ejemplo, las variantes de un ácido nucleico de un virus infeccioso (por ejemplo, VIH, VHB, VHC, etc.) son variantes del ácido nucleico diana. En algunos modos de realización, la diferencia entre dos variantes en una secuencia de ácido nucleico diana se producirá en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de nucleótidos. Como se describe con más detalle en el presente documento, en algunos modos de realización, el ácido nucleico diana tiene una región de secuencia en la que una secuencia de cebador puede hibridar en condiciones de amplificación, y adyacente (es decir, dentro del amplicón resultante, no necesariamente directamente adyacente) a esa posición, la variación de secuencia se producirá de tal manera que cuando el cebador se extiende para formar un amplicón, el amplicón comprende al menos una posición variante.

Como se usa en el presente documento, el término «T<sub>m</sub>» se usa en referencia a la «temperatura de fusión». La temperatura de fusión es la temperatura a la que una mitad de una población de polinucleótidos u oligómeros de nucleobases bicatenarios (por ejemplo, complejos de hibridación), en homodúplex o heterodúplex, se disocian en hebras simples. La predicción de una T<sub>m</sub> de un polinucleótido dúplex tiene en cuenta la secuencia de las bases así como otros factores, incluyendo características estructurales y de secuencia y la naturaleza de los enlaces oligoméricos. Los procedimientos para predecir y determinar experimentalmente la T<sub>m</sub> son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, una T<sub>m</sub> se determina tradicionalmente por una curva de fusión, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta en un programa de temperatura controlada, y el estado de asociación/disociación de las dos hebras simples en el dúplex se controla y se representa gráficamente hasta alcanzar una temperatura en la que

las dos hebras estén completamente disociadas. La  $T_m$  se lee a partir de esta curva de fusión. De forma alternativa, se puede determinar una  $T_m$  mediante una curva de disociación-asociación, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta hasta una temperatura en la que las dos hebras estén completamente disociadas. La temperatura se reduce entonces en un programa de temperatura controlada, y el estado de asociación/disociación de las dos hebras simples en el dúplex se controla y se representa gráficamente hasta alcanzar una temperatura en la que las dos hebras estén completamente asociadas. La  $T_m$  se lee a partir de esta curva de disociación-asociación.

No se pretende que la invención se limite a un procedimiento particular para la determinación de la  $T_m$ . Los procedimientos para la determinación experimental de la  $T_m$  son ampliamente conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, por ejemplo Liew et al., «Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphism by High-Resolution Melting of Small Amplicons», *Clinical Chemistry* 50(7):1156-1164 (2004); Reed y Wittwer «Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis», *Clinical Chemistry* 50(10):1748-1754 (2004); Zhou et al., «Closed-Tube Genotyping with Unlabeled Oligonucleotide Probes and a Saturating DNA Dye», *Clinical Chemistry* 50(8):1328-1335 (2004); y Zhou et al., «High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity», *Tissue Antigens* 64:156-164 (2004). Los instrumentos de análisis de la curva de fusión/disociación-asociación están disponibles comercialmente a partir de una variedad de fabricantes.

Como se usa en el presente documento, el término «muestra» se usa en su sentido más amplio, y se refiere a cualquier material sujeto a análisis. El término «muestra» se refiere típicamente a cualquier tipo de material de origen biológico, por ejemplo, cualquier tipo de material obtenido de animales o plantas. Una muestra puede ser, por ejemplo, cualquier líquido o tejido tal como sangre o suero y, además, puede ser sangre humana o suero humano. Una muestra puede ser células o tejidos cultivados, cultivos de microorganismos (procariotas o eucariotas), o cualquier fracción o productos producidos a partir de materiales biológicos (vivos o que una vez estuvieron vivos) o derivados de ellos. Opcionalmente, una muestra puede purificarse, purificarse parcialmente, no purificarse, enriquecerse o amplificarse. Cuando una muestra se purifica o enriquece, la muestra puede comprender principalmente un componente, por ejemplo ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, una muestra purificada o amplificada puede comprender ARN celular total, ARNm celular total, ADNc, ARNc o un producto amplificado derivado de ellos.

La muestra utilizada en los procedimientos de la invención puede ser de cualquier fuente, y no está limitada. Dicha muestra puede ser una cantidad de tejido o líquido aislado de un individuo o individuos, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa, hemoderivados, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido peritoneal, líquido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, glóbulos sanguíneos, hemoderivados, semen, líquido seminal, secreciones vaginales, derrame pulmonar, líquido seroso, órganos, lavado broncoalveolar, tumores, tejidos incluidos en parafina, etc. Las muestras también incluyen constituyentes y componentes de cultivos celulares *in vitro*, incluyendo, pero no limitados a, medio condicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### ***I. Introducción***

La presente solicitud proporciona procedimientos para detectar eficazmente la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en el que el ácido nucleico diana puede tener un número de variantes diferentes. Los procedimientos de la presente invención permiten la detección de variantes del ácido nucleico diana y permiten la diferenciación entre variantes, permitiendo de este modo la determinación de qué variante del ácido nucleico diana está presente en una muestra. Una ventaja de la invención es la capacidad para detectar y diferenciar entre un número relativamente grande de posibles variantes del ácido nucleico diana sin el uso de una «sonda» tal como se usa típicamente en reacciones de amplificación en tiempo real. Por lo tanto, en algunos modos de realización, los procedimientos de la invención no incluyen una «sonda» (es decir, un oligonucleótido marcado que no se extiende por una polimerasa sino que hibrida y se usa para detectar la presencia o ausencia de un molde o amplicón).

La presente invención es útil para técnicas diagnósticas moleculares, genotipado de patógenos, cáncer u otro, detección de polimorfismos mononucleotídicos (SNP), análisis de detección de patógenos farmacorresistentes u otras aplicaciones en las que se desea la detección de ácidos nucleicos.

En algunos modos de realización, la presente invención proporciona un procedimiento mediante el cual oligonucleótidos cebadores, marcados con un marcador emisor de luz, se ponen en contacto con polinucleótidos de una muestra y se usan para amplificar un ácido nucleico diana, si está presente, de la muestra. Las secuencias del cebador están diseñadas de tal manera que el cebador hibridará con la secuencia del ácido nucleico diana durante una reacción de amplificación, permitiendo de este modo la amplificación del ácido nucleico diana. El amplicón resultante está diseñado para comprender secuencias dentro de la secuencia diana que pueden variar entre las variantes del ácido nucleico diana elegibles. Como ejemplo, en algunos modos de realización, puede conocerse que las secuencias del ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) pueden producirse en tres variantes. El cebador

está diseñado de tal manera que el amplicón resultante comprenderá cualquiera de las tres posibles variantes que pueden existir en el molde. Por lo tanto, en algunos modos de realización, cuando hay al menos dos variantes del molde presentes, se pueden generar dos o más variantes del amplicón a partir de un oligonucleótido marcado. En dichos casos, en algunos modos de realización, la T<sub>m</sub> de los amplicones generados a partir del mismo oligonucleótido marcado variará suficientemente (por ejemplo, 5 °C) entre unos y otros, de tal manera que los dos o más amplicones se puedan distinguir por un análisis de las curvas de fusión.

La invención permite la diferenciación de la presencia de amplicones (incluyendo el marcador emisor de luz presente en el cebador) de diferentes variantes de ácido nucleico diana mediante la detección de la temperatura de fusión de los amplicones resultantes, en el que el amplicón potencial procedente de cada variante diana se puede distinguir por tener una temperatura de fusión diferente. La temperatura de fusión de los amplicones se determina fácilmente debido a la presencia de un modificador soluble de la emisión de luz que se asocia con ácidos nucleicos bicatenarios pero no se asocia significativamente con ácidos nucleicos monocatenarios. El modificador soluble de la emisión de luz, cuando está asociado con ácidos nucleicos bicatenarios marcados con marcadores emisores de luz (por ejemplo, los amplicones), altera la señal del marcador de tal manera que la señal del marcador cuando se incorpora en ácidos nucleicos monocatenarios se puede distinguir de la señal del mismo marcador cuando se incorpora en ácidos nucleicos bicatenarios, permitiendo así una determinación de la temperatura de fusión. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el modificador soluble de la emisión de luz extingue la señal del marcador cuando el amplicón es bicatenario pero no extingue significativamente la señal cuando el amplicón es monocatenario.

Una ventaja de los procedimientos de la presente invención es que se puede distinguir un número relativamente grande de diferentes variantes posibles. El número de variantes detectadas se puede acomodar en los procedimientos al menos de dos maneras: (1) usando la temperatura de fusión para distinguir entre diferentes amplicones posibles, cada uno con el mismo marcador, y (2) utilizando cebadores con diferentes marcadores. Estas opciones se pueden usar en combinación para permitir la detección de un gran número de diferentes variantes posibles.

En un ejemplo sencillo de la opción (1), se pueden detectar dos variantes usando un cebador marcado que permita la producción de un amplicón que podría incluir cualquiera de las dos variantes posibles. Qué variante (suponiendo que solo una esté presente) se produce en una muestra se determina detectando la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del amplicón, en la que T<sub>m1</sub> es la temperatura de fusión del amplicón si está presente la variante 1 y T<sub>m2</sub> es la temperatura de fusión del amplicón si está presente la variante 2, en la que T<sub>m1</sub> y T<sub>m2</sub> son diferentes y se distinguen por el procedimiento de determinación de T<sub>m</sub> utilizado. En algunos modos de realización, el cebador marcado está diseñado para detectar 3, 4, 5, 6, 7 o más variantes diferentes, cada una diferenciada de las demás por la T<sub>m</sub>. El número de variantes que pueden detectarse mediante la opción (1) está limitado por el número de temperaturas de fusión diferentes que pueden distinguirse utilizando las variantes que se pretende detectar. Obsérvese que puede haber más de una variante molde en la muestra y, si están presentes, en algunos modos de realización, ambas variantes pueden seleccionarse y detectarse la presencia o ausencia del amplicón de cada variante detectando la T<sub>m</sub> distintiva de cada amplicón.

En un ejemplo sencillo de la opción (2) que implica las mismas dos variantes analizadas anteriormente, se usan un cebador marcado con un primer marcador emisor de luz y un segundo cebador marcado con un segundo marcador emisor de luz distinguible para amplificar polinucleótidos en la muestra. Los dos cebadores diferentes están diseñados de tal manera que hibridan con diferentes secuencias diana de manera que un primer cebador solo se integre en un amplicón con ácidos nucleicos diana de la variante 1, pero no se integre en un amplicón con ácidos nucleicos diana de la variante 2. De manera similar, el segundo cebador solo se integra en un amplicón con ácidos nucleicos diana de la variante 2, pero no se integra en un amplicón con ácidos nucleicos diana de la variante 1. La variante 1 y la variante 2 se distinguen entonces por la presencia de señal del marcador del cebador 1 o del cebador 2 en el amplicón bicatenario. El número de variantes que pueden detectarse mediante la opción (2) está limitado por el número de marcadores de cebadores diferentes que se pueden usar y detectar.

Los procedimientos de la invención son de uso particular cuando se combinan las opciones (1) y (2). Por ejemplo, cuando se desea poder detectar más de 2 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, etc., por ejemplo, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 8, etc.) variantes, se puede «asignar» cierto número de variantes a un primer cebador marcado (es decir, se puede diseñar un cebador para amplificar ese cierto número de variantes, designadas en el presente documento por motivos de comodidad como «variantes del cebador 1»), en el que cada una de las T<sub>m</sub> de los amplicones que comprenden las diferentes «variantes del cebador 1» son diferentes y, por lo tanto, pueden distinguirse. Un segundo cebador, marcado con un marcador diferente, se asigna a un segundo conjunto de variantes («variantes del cebador 2»), en el que, de nuevo, cada uno de los amplicones de estas variantes del cebador 2 tiene una T<sub>m</sub> diferente. Después de la amplificación y detección de la señal de los marcadores del cebador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz en un ensayo de determinación de la temperatura de fusión, se puede determinar qué variante estaba presente basándose en qué marcador del cebador se detecta y a qué temperatura de fusión tuvo lugar la alteración de la señal del marcador. Este modo de realización de la «opción (1)/(2)», es, por lo tanto, superior a los procedimientos de la técnica anterior al permitir la detección eficaz de un número mucho mayor de variantes de las que anteriormente era prácticamente posible. Obsérvese que la opción «1/2» permite una reducción del número de cebadores y el número de marcadores

diferentes que de otro modo serían necesarios para la detección de un número determinado de variantes usando reacciones de multiplexación estándar.

### ***II Oligonucleótidos cebadores***

Los oligonucleótidos cebadores usados de acuerdo con la invención están diseñados de manera que las secuencias variantes deseadas se incorporen en un amplicón durante una reacción de amplificación en presencia de la secuencia de la variante del ácido nucleico diana apropiada. Así, por ejemplo, los cebadores pueden hibridar en una reacción de amplificación en dirección 5' de donde se produce la variación particular (por ejemplo, un SNP u otra variación distintiva) en el ácido nucleico diana. En algunos modos de realización, el cebador puede diseñarse para hibridar con la secuencia de la variación pertinente. En algunos modos de realización, las condiciones de la reacción de amplificación se establecen, en general, de tal manera que no se requiere la complementariedad absoluta para dar lugar a la hibridación y la extensión del cebador. En otros modos de realización, las condiciones de la reacción de amplificación se establecen de tal manera que el cebador solo hibrida si hay complementariedad absoluta con el molde.

Dependiendo del tipo de reacción de amplificación usado, se proporcionan cebadores directos e inversos para cada amplicón que deba generarse. Así, en algunos modos de realización, se usa un cebador directo marcado y un cebador inverso no marcado para generar un amplicón. Por ejemplo, el amplicón generado por el cebador directo e inverso puede generarse a partir de cualquier número de secuencias de variantes de manera que el amplicón tenga una T<sub>m</sub> diferente dependiendo de qué variante diana se amplifica. Para los propósitos de este análisis, «directo» e «inverso» pueden intercambiarse.

Cuando se usa más de un cebador marcado (por ejemplo, para detectar un mayor número de variantes potenciales), cada cebador marcado puede tener también un cebador inverso correspondiente. De forma alternativa, los cebadores marcados se pueden diseñar para hibridar con diferentes secuencias en el ácido nucleico diana, pero emplean, no obstante, el mismo cebador inverso en la reacción de amplificación. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse diversas combinaciones de cebadores directos e inversos, dependiendo del número de cebadores marcados diferencialmente usados, de las variantes de ácido nucleico diana que deban detectarse, etc.

Los cebadores son, en general, de longitud y complementariedad suficientes para que se unan selectivamente a ácidos nucleicos diana en condiciones seleccionadas para permitir que tenga lugar una escisión independiente de la polimerización o una escisión dependiente de la polimerización. La longitud y composición exactas del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura de la reacción de renaturalización, la fuente y la composición del cebador, etc. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador típicamente incluye aproximadamente 15-30 nucleótidos, aunque puede contener más o menos nucleótidos.

En ciertos modos de realización, se incluyen nucleótidos modificados en los cebadores. A título ilustrativo, la introducción de sustituciones de nucleótidos modificados en secuencias de oligonucleótidos puede, por ejemplo, aumentar la temperatura de fusión de los oligonucleótidos. En algunos modos de realización, esto puede producir una mayor sensibilidad con respecto a los correspondientes oligonucleótidos no modificados, incluso en presencia de uno o más emparejamientos erróneos en la secuencia entre el ácido nucleico diana y el oligonucleótido particular. Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden sustituir o añadir en oligonucleótidos incluyen, por ejemplo, C5-etil-dC, C5-etil-dU, 2,6-diaminopurinas, C5-propinil-dC, C7-propinil-dA, C7-propinil-dG, C5-propargilamino-dC, C5-propargilamino-dU, C7-propargilamino-dA, C7-propargilamino-dG, 7-desaza-2-desoxixantósina, análogos de pirazolopirimidina, pseudo-dU, nitropirrol, nitroindol, 2'-O-metil Ribo-U, 2'-O-metil Ribo-C, un 8-aza-dA, un 8-aza-dG, un 7-desaza-dA, un 7-desaza-dG, N4-etil-dC, N6-metil-dA, etc. A título ilustrativo adicional, otros ejemplos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que tienen uno o más monómeros LNA™. También se describen análogos nucleotídicos como estos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 6.639.059, concedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine et al., la patente de EE. UU. N.º 6.303.315, concedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2003/0092905, titulada por Kochkine et al. que fue publicada el 15 de mayo de 2003. Los oligonucleótidos que comprenden monómeros LNA™ están disponibles comercialmente a través, por ejemplo, de Exiqon A/S (Vedbaek, DK).

### ***III. Marcadores y modificadores solubles de la emisión de luz***

Se apreciará que puede utilizarse una amplia gama de diferentes marcadores emisores de luz y modificadores solubles de la emisión de luz, de tal manera que su combinación permita la alteración (por ejemplo, extinción) de la señal del marcador cuando el marcador se incorpora en un ácido nucleico bicatenario en presencia del modificador soluble de la emisión de luz en comparación con cuando el marcador se incorpora en un ácido nucleico monocatenario en presencia del modificador soluble de la emisión de luz.

### ***Marcadores***

Como se describe en el presente documento, al menos un cebador para cada reacción de amplificación está marcado para permitir la detección del amplicón resultante que comprende la secuencia del cebador marcado. En general, un marcador puede ser cualquier resto que se pueda unir a un ácido nucleico y proporcionar una señal detectable (por ejemplo, una señal cuantificable). La señal del marcador se puede distinguir dependiendo de si el marcador se incorpora en ácidos nucleicos bicatenarios o monocatenarios. Los marcadores pueden unirse a oligonucleótidos directa o indirectamente mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. A título ilustrativo, dependiendo del tipo de marcador usado, el marcador puede unirse a un nucleótido terminal (extremo 5' o 3' de un cebador oligonucleotídico) o no terminal, y puede unirse indirectamente a través de engarces o brazos espaciadores de varios tamaños y composiciones. Usando reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente, se pueden producir oligonucleótidos que contienen grupos funcionales (por ejemplo, tioles o aminas primarias) en el extremo 5' o 3' a través de una fosforamidita apropiadamente protegida, y se pueden marcar dichos oligonucleótidos usando protocolos descritos, por ejemplo, en Innis et al. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Elsevier Science & Technology Books (1990) (Innis).

Esencialmente, cualquier resto marcador emisor de luz se utiliza opcionalmente para marcar un cebador mediante técnicas bien conocidas en la técnica. En algunos modos de realización, por ejemplo, los marcadores comprenden un colorante fluorescente (por ejemplo, un colorante de rodamina (por ejemplo, R6G, R110, TAMRA, ROX, etc.), un colorante de fluoresceína (por ejemplo, JOE, VIC, TET, HEX, FAM, etc.), un colorante de halofluoresceína, un colorante de cianina (por ejemplo, CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, etc.), un colorante BODIPY® (por ejemplo FL, 530/550, TR, TMR, etc.), un colorante ALEXA FLUOR® (por ejemplo, 488, 532, 546, 568, 594, 555, 653, 647, 660, 680, etc.), un colorante de diclororodamina, un colorante de transferencia de energía (por ejemplo, colorantes BIGDYE™ v 1, colorantes BIGDYE™ v 2, colorantes BIGDYE™ v 3, etc.), colorantes Lucifer (por ejemplo, amarillo Lucifer, etc.), CASCADE BLUE®, Oregon Green y similares. Ejemplos adicionales de colorantes fluorescentes se proporcionan, por ejemplo, en Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9.<sup>a</sup> ed. (2003) y sus actualizaciones. Los colorantes fluorescentes están, en general, disponibles fácilmente a través de diversos proveedores comerciales incluyendo, por ejemplo, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ), Applied Biosystems (Foster City, CA). Otros marcadores incluyen, por ejemplo, biotina, marcadores débilmente fluorescentes (Yin et al. (2003) Appl Environ Microbiol. 69(7):3938, Babendure et al. (2003) Anal. Biochem. 317(1):1 y Jankowiak et al. (2003) Chem Res Toxicol. 16 (3):304), marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes (Wilson et al. (2003) Analyst. 128(5):480 y Roda et al. (2003) Luminescence 18(2):72), marcadores Raman, marcadores electroquímicos, marcadores bioluminiscentes (Kitayama et al. (2003) Photochem Photobiol. 77(3):333, Arakawa et al. (2003) Anal. Biochem. 314(2):206 y Maeda (2003) J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (6):1725), y un reactivo marcador alfa-metil-PEG como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 7.220.847, titulada «DETECTABLE LABELED NUCLEOSIDE ANALOGS AND METHODS OF USE THEREOF», que fue concedida a Bodepudi et al. 22 de mayo de 2007.

A título ilustrativo adicional, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, ya sea estándar o no estándar) se puede personalizar o se puede solicitar en un pedido estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company, The Great American Gene Company, ExpressGen Inc., Operon Technologies Inc., Proligo LLC y muchas otras.

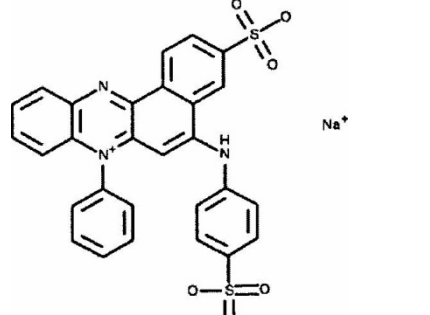
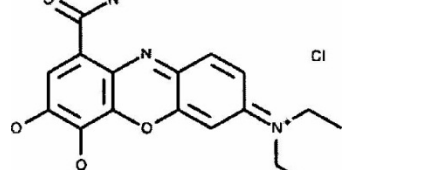
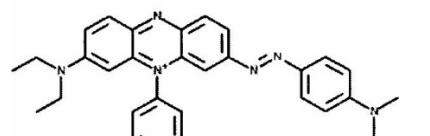
#### **Modificadores solubles de la emisión de luz**

Los modificadores de la emisión de luz usados en los procedimientos de la invención incluyen típicamente una variedad de propiedades que los hacen adecuados para modular emisiones de luz de oligonucleótidos marcados en diversos tipos de reacciones y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. En algunos modos de realización, estos modificadores de la emisión de luz se unen de forma no covalente tanto a ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, sondas monocatenarias) como a ácidos nucleicos bicatenarios (por ejemplo, sondas monocatenarias hibridadas con ácidos nucleicos diana). Sin embargo, los modificadores de la emisión de luz se unen a ácidos nucleicos monocatenarios mucho más débilmente que a los ácidos nucleicos bicatenarios. Por ejemplo, algunos modificadores solubles de la emisión de luz se intercalan en ácidos nucleicos bicatenarios. Como resultado, los modificadores de la emisión de luz alteran significativamente la señal de los ácidos nucleicos bicatenarios marcados en comparación con los ácidos nucleicos monocatenarios, permitiendo de este modo una determinación de si los ácidos nucleicos son mono o bicatenarios. En algunos modos de realización, un modificador de la emisión de luz dado es capaz de modificar eficazmente la emisión de luz de una variedad de diferentes restos emisores de luz. En otras palabras, las modificaciones (por ejemplo, extinción) efectuadas por estos modificadores de la emisión de luz son, en general, superposición espectral independiente o universal y sin estar ligada a ninguna teoría particular de funcionamiento, probablemente se producirán mediante la formación de complejos en el estado fundamental. Esto permite el uso de múltiples marcadores con un modificador de la emisión de luz. Por supuesto, se puede usar más de un modificador de la emisión de luz cuando se desee.

Muchos modificadores de la emisión de luz diferentes son adecuados para su uso en los procedimientos de la invención. Los modificadores de la emisión de luz son compuestos de unión a ácidos nucleicos solubles que son capaces de modificar la emisión de luz de oligonucleótidos marcados, por ejemplo, marcados con un marcador fluorescente, opcionalmente a temperaturas de reacción comúnmente usadas en la realización de las etapas de reacción de la PCR en tiempo real, tal como temperaturas de renaturalización de al menos aproximadamente 40 °C.

5 En algunos modos de realización, por ejemplo, los modificadores de la emisión de luz utilizados de acuerdo con la invención incluyen diversos colorantes de diazina y tiazina. Ejemplos de colorantes de diazina que pueden usarse como modificadores de la emisión de luz incluyen, por ejemplo, colorantes de azocarmina (por ejemplo, azocarmina A, azocarmina B (C<sub>28</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>), azocarmina G (C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Na), etc.), colorantes de fenazina, colorantes de oxazina (por ejemplo, azul Celestino (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), etc.), cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina (es decir, Janus Verde B o Diazina Verde 5 (C<sub>28</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>Cl)), y similares. Las estructuras químicas de algunos de estos colorantes de diazina se presentan en la tabla I.

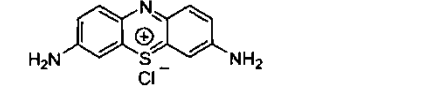
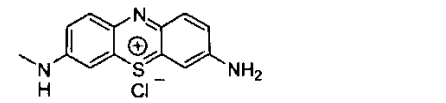
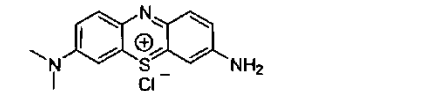
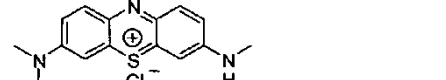
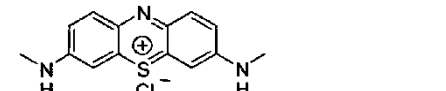
**TABLA I**

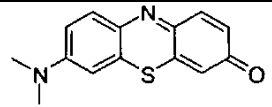
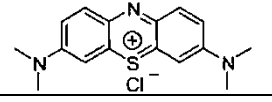

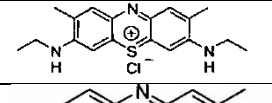
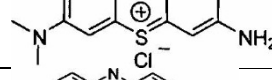
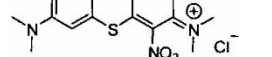
AZOCARMINA G	
AZUL CELESTINO	
JANUS VERDE B	

10 A título ilustrativo adicional, los ejemplos de colorantes de tiazina que se pueden usar como modificadores de la emisión de luz incluyen, por ejemplo, azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S), verde de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S), tionina (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>S), sim-dimetiltionina, azul O de toluidina (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>SCI), nuevo azul de metileno (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>S), violeta de metileno bernthsen, azul A (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>S), azul B (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>S), azul C (C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>S) y similares. Las estructuras químicas de algunos de estos colorantes de tiazina se presentan en la tabla II.

15

**TABLA II**

TIONINA	
Azul C	
Azul A	
Azul B	
SIM-DIMETILTIONINA	

VIOLETA DE METILENO BERNTHSEN	
AZUL DE METILENO	
AZUL DE 1,9-DIMETILMETILENO	
NUEVO AZUL DE METILENO	
AZUL DE TOLUIDINA O	
VERDE DE METILENO	

La cantidad del modificador de la emisión de luz particular incluido en una mezcla de reacción dada depende típicamente del grado de modificación buscada. Típicamente, el grado de modificación de la emisión de luz es proporcional a la cantidad de modificador de la emisión de luz presente en una mezcla de reacción. Aunque se utilizan opcionalmente otras cantidades, en algunos modos de realización, los modificadores de la emisión de luz están presentes a entre aproximadamente 5 µg/ml de la mezcla de reacción y aproximadamente 100 µg/ml de la mezcla de reacción, por ejemplo, entre aproximadamente 10 µg/ml de la mezcla de reacción y aproximadamente 75 µg/ml de la mezcla de reacción, por ejemplo, entre aproximadamente 15 µg/ml de la mezcla de reacción y aproximadamente 50 µg/ml de la mezcla de reacción (por ejemplo, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, etc.). En algunos modos de realización, las mezclas de reacción incluyen concentraciones de modificador de la emisión de luz que superan las concentraciones de amplicón. En algunos modos de realización, se puede usar más de un modificador de la emisión de luz en la misma mezcla de reacción. En estos modos de realización, los diferentes modificadores de la emisión de luz están opcionalmente presentes en la misma o en diferentes concentraciones en la mezcla de reacción particular. Como ejemplo, una mezcla de reacción puede incluir 20 µg de nuevo azul de metileno por ml de la mezcla de reacción y 30 µg de azul de metileno por ml de la mezcla de reacción. Los modificadores de la emisión de luz están fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EE. UU.).

#### IV Ácidos nucleicos diana

Los ácidos nucleicos diana pueden proceder de una fuente biológica o sintética. La diana puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. En general, cuando se generan amplicones, los amplicones estarán compuestos de ADN, aunque también se pueden incorporar ribonucleótidos o nucleótidos sintéticos en el amplicón. Cuando se desea detectar un ARN, el procedimiento de amplificación implicará típicamente el uso de transcripción inversa, incluyendo, por ejemplo, PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

Las secuencias diana específicas pueden incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos (por ejemplo, VIH, VHB, VHC, HPV), ácidos nucleicos bacterianos (por ejemplo, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*) ácidos nucleicos fúngicos, o ácidos nucleicos de animales o plantas. En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos diana son ácidos nucleicos humanos. En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos diana son, por ejemplo, regiones genéticas humanas que pueden incluir variantes asociadas con enfermedades (por ejemplo, cáncer (incluyendo pero no limitado a oncogenes y genes supresores de tumores), diabetes, etc.).

#### V. Amplificación

En la práctica de los procedimientos de la presente invención, se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales en biología molecular. Estas técnicas son bien conocidas y se explican, por ejemplo, en Ausubel et al. (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II y III, (1997) (Ausubel 1), Ausubel et al. (Eds.), Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5.<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc. (2002) (Ausubel 2), Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000) (Sambrook), Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques: Methods in Enzymology, Volumen 152, Academic Press, Inc. (Berger), Vorbruggen et al, Handbook of Nucleoside Synthesis, Organic Reactions Series, n.º 60, John Wiley & Sons, Inc. (2001), Gait (Ed.) Oligonucleotide Synthesis, Oxford

University Press (1984), Hames y Higgins, Nucleic Acid Hybridization, Practice Approach Series, Oxford University Press (1997), y Hames y Higgins (Eds.) Transcription and Translation, Practical Approach Series, Oxford University Press (1984).

5 Los ejemplos de tipos generales de tecnologías de análisis de ácidos nucleicos que se pueden usar o adaptar para su uso para analizar ácidos nucleicos diana en o desde mezclas de reacción incluyen diversos ensayos de  
 10 amplificación de ácidos nucleicos. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos pueden tener mayor sensibilidad que otros métodos para el análisis de ácidos nucleicos. Esta sensibilidad, que se mejora además con el uso de los modificadores de la emisión de luz de los procedimientos de la invención, es típicamente atribuible a su  
 15 capacidad para producir una señal positiva desde tan solo una única copia del ácido nucleico diana. Los procedimientos de amplificación que opcionalmente se utilizan o adaptan para detectar ácidos nucleicos diana incluyen, por ejemplo, diversos procedimientos de amplificación mediados por la polimerasa, la ligasa o la transcriptasa inversa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), PCR con transcripción inversa (RT-PCR), NASBA, TMA, SDA y similares. Se pueden encontrar detalles  
 20 adicionales sobre el uso de estos y otros procedimientos de amplificación y diversos métodos para la preparación de muestras para estos ensayos en cualquiera de una variedad de textos estándar, incluyendo, por ejemplo, Berger, Sambrook, Ausubel 1 y 2 e Innis, que se citan anteriormente. Diversos ensayos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos que se adaptan opcionalmente para su uso con los modificadores de la emisión de luz y los procedimientos de la invención difieren, en general, en sus procedimientos de amplificación y sus secuencias de  
 25 ácido nucleico diana. Ejemplos de estas pruebas comerciales incluyen los ensayos AMPLICOR® y COBAS AMPLICOR® (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, EE. UU.), que usan reacciones en cadena de la polimerasa (PCR); la prueba LCx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE. UU.), que usa reacciones en cadena de la ligasa (LCR); la prueba BDProbeTec™ ET (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), que usa amplificación por desplazamiento de hebra (SDA); el ensayo NucliSens EasyQ (bioMérieux, Durham, NC), que usa amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA); y el ensayo APTIMA™ (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, EE. UU.), que usa amplificación mediada por transcripción (TMA). La amplificación y detección de ácidos nucleicos se describe además más adelante.

30 La extensión de cebadores dependiente del molde se cataliza, en general, por un nucleótido que incorpora un biocatalizador (por ejemplo, una polimerasa, etc.) en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) o análogos en una mezcla de reacción que también incluye modificadores de la emisión de luz y sales apropiadas, cationes metálicos y tampones. Las mezclas de reacción se describen además anteriormente. Los nucleótidos adecuados que incorporan biocatalizadores son enzimas conocidas por catalizar el cebador y la síntesis de ADN dependiente del molde y poseen la actividad nucleasa 5' a 3'.  
 35 Ejemplos de ADN-polimerasas de este tipo incluyen ADN-polimerasa I de *E. coli*, ADN-polimerasa de *Tth*, ADN-polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, ADN-polimerasa de *Taq*, ADN-polimerasa de *Thermus sp.* Z05, ADN-polimerasa de *Thermatoga maritima*, ADN-polimerasa de *Thermatoga neopolitana* y ADN-polimerasa de *Thermosiphon africanus*. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN-polimerasas son bien conocidas en la técnica. Típicamente, el nucleótido que incorpora el biocatalizador escinde eficientemente la sonda y libera fragmentos marcados de manera que se genera una señal detectable directa o indirectamente.

40 Los productos de la síntesis son, en general, moléculas dúplex que incluyen las hebras molde y las hebras de extensión del cebador. Los subproductos de esta síntesis son fragmentos de sonda, que pueden incluir una mezcla de fragmentos de mono-, dinucleótidos y mayores. Los ciclos repetidos de desnaturalización, renaturalización de sonda y cebador, y extensión del cebador y escisión de la sonda dan como resultado la acumulación exponencial de la región definida por los cebadores y la generación exponencial de fragmentos marcados. Se ejecutan ciclos suficientes para conseguir una cantidad detectable de fragmentos de sonda, que es, en general, varios órdenes de magnitud mayor que la señal de fondo. El uso de modificadores de la emisión de luz como se describe en el presente documento puede reducir eficazmente el número de ciclos ejecutados antes de que se produzca una señal detectable con respecto a ensayos que no reducen estas señales de fondo.  
 45 50

55 En ciertos modos de realización, las reacciones de PCR se llevan a cabo como un procedimiento automatizado, que utiliza una enzima termoestable. En este procedimiento, la mezcla de reacción se somete a ciclos a través de una etapa de desnaturalización, una etapa de renaturalización del cebador (y opcionalmente, la sonda) y una etapa de síntesis en la que la escisión y el desplazamiento se producen simultáneamente con la extensión del molde dependiente del cebador. En algunos modos de realización, los procedimientos descritos en el presente documento se realizan usando un sistema. Dichos sistemas se describen con mayor detalle a continuación. Opcionalmente, pueden utilizarse termocicladores, tales como los disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.), que están diseñados para su uso con enzimas termoestables.  
 60

65 Las polimerasas termoestables se usan típicamente en procedimientos automatizados que efectúan la desnaturalización de productos de extensión bicatenarios exponiéndolos a temperaturas elevadas (por ejemplo, aproximadamente 95 °C) durante el ciclo de PCR. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.889.818, titulada «PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME», concedida el 26 de diciembre de 1989 a Gelfand et al., divulga una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus*. Polimerasas termoestables representativas adicionales incluyen, por ejemplo, polimerasas extraídas de las bacterias termoestables *Thermus flavus*, *Thermus*



*ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que tiene una temperatura un poco menos óptima que las otras listadas), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus littoralis* y *Methanothermobacter fervidus*.

5 La hibridación de sondas con ácidos nucleicos diana se puede conseguir eligiendo condiciones de hibridación apropiadas. La estabilidad del híbrido de sonda:ácido nucleico diana se selecciona típicamente para ser compatible con las condiciones de ensayo y de lavado, de modo que se formen híbridos estables detectables solamente entre las sondas y los ácidos nucleicos diana. La manipulación de uno o más de los diferentes parámetros de ensayo determina la sensibilidad y especificidad exactas de un ensayo de hibridación particular.

10 Más específicamente, la hibridación entre bases complementarias de ADN, ARN, PNA o combinaciones de ADN, ARN y PNA se produce en una amplia variedad de condiciones que varían en temperatura, concentración de sales, resistencia electrostática, composición del tampón y similares. Ejemplos de estas condiciones y procedimientos para aplicarlas se describen, por ejemplo, en Tijssen, Hybridization with Nucleic Acid Probes, Vol. 24, Elsevier Science (1993), y Hames y Higgins, *supra*. La hibridación tiene lugar, en general, entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 70 °C, durante periodos de aproximadamente un minuto a aproximadamente una hora, dependiendo de la naturaleza de la secuencia que debe hibridar y de su longitud. Sin embargo, se reconoce que las hibridaciones pueden producirse en segundos u horas, dependiendo de las condiciones de la reacción. A título ilustrativo, las condiciones típicas de hibridación para una mezcla de dos 20 mer es llevar la mezcla a 68 °C, seguido por enfriamiento a temperatura ambiente (22 °C) durante cinco minutos o a temperaturas muy bajas tales como 2 °C en 2 microlitros. La hibridación entre ácidos nucleicos se puede facilitar usando tampones tales como Tris-EDTA (TE), Tris-HCl y HEPES, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>) u otras soluciones acuosas, reactivos y productos químicos. Ejemplos de estos reactivos incluyen proteínas de unión monocatenarias tales como la proteína Rec A, la proteína 32 del gen *T4*, la proteína de unión monocatenaria de *E. coli* y las proteínas de unión al surco de ácido nucleico mayor o menor. Otros ejemplos de dichos reactivos y productos químicos incluyen iones divalentes, iones polivalentes y sustancias intercalantes tales como bromuro de etidio, actinomicina D, psoraleno y angelicina.

#### VI. Temperatura de fusión

30 La invención proporciona procedimientos para determinar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de un complejo de hibridación, en el que estos procedimientos utilizan la tecnología de los modificadores solubles de la emisión de luz enseñada en el presente documento. Las determinaciones de la  $T_m$  usan un modificador soluble de la emisión de luz (es decir, un extintor soluble) para controlar la curva de fusión o la curva de disociación-asociación del dúplex.

35 Se incorpora un cebador marcado con un resto emisor de luz adecuado (por ejemplo, un donante) en un amplicón bicatenario. Cualquier dúplex de ácido nucleico se caracteriza por una  $T_m$  particular en un conjunto dado de condiciones de hibridación. Es esta característica la que hace que las determinaciones de la  $T_m$  sean útiles en aplicaciones tales como técnicas diagnósticas (por ejemplo, detección de SNP, detección de mutaciones y búsqueda de mutaciones, genotipado vírico, pruebas de detección de cepas farmacorresistentes, etc.) y permite la diferenciación entre variantes.

40 Ya sea antes, durante o después de la formación del dúplex, la reacción se mezcla con un modificador solución de la emisión de luz adecuado (por ejemplo, un extintor). Este extintor soluble comprende un colorante de tiazina o un colorante de diazina, en el que el extintor soluble es capaz de extinguir el resto emisor de luz incorporado en el amplicón (formando así un par donador-aceptor). Se observa que tiazina, fenotiazina, tiazinas catiónicas, tiazinio y fenotiazinio son todos sinónimos de un nombre genérico para la familia de colorantes con un sistema aromático de 3 anillos condensados que contiene un nitrógeno y un azufre en el anillo central. Además, además de las estructuras particulares de tiazina y diazina enseñadas en el presente documento, también pueden usarse con los procedimientos de la invención variantes estructurales relacionadas de estas moléculas que retienen la propiedad soluble del extintor.

45 Un extintor soluble del colorante de tiazina o de diazina actúa uniéndose a ácido nucleico tanto monocatenario como bicatenario, pero tiene afinidad reducida por el ácido nucleico monocatenario. Se contempla que la unión a los ácidos nucleicos monocatenarios podría deberse a estructuras secundarias parciales en el estado de ovillo estadístico. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que el modo de unión predominante es a través de la intercalación, pero también es posible la unión al surco mayor y menor dependiendo del contexto de la secuencia y de las condiciones de hibridación (véanse Rohs et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:2860-2866; y Tuite et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116:7548-7556). Por lo tanto, el marcador donador de fluorescencia unido al cebador que forma el complejo de hibridación con un polinucleótido diana está sometido a un efecto de extinción por el extintor soluble intercalante que tiene afinidad por el ácido nucleico bicatenario debido a la estrecha proximidad del extintor al resto donador en el amplicón (del cebador incorporado). Sin embargo, no se requiere una comprensión de los mecanismos moleculares del fenómeno de extinción para llevar a cabo o usar la invención.

60 Si se calienta la solución que contiene el complejo de hibridación (como en el análisis de la  $T_m$  en la curva de fusión), el amplicón eventualmente se disocia (es decir, ya no es bicatenario) del polinucleótido diana, reduciendo de este modo la afinidad del extintor por el ácido nucleico, lo que da lugar a una proximidad reducida del extintor soluble

al donante y se observa un aumento de la fluorescencia del donante. Por tanto, la formación/disociación de complejos de hibridación en una reacción se puede controlar mediante el uso de un sistema que tiene un extintor soluble.

5 Después de la formación del dúplex en condiciones en las que puede producirse apareamiento de bases, se eleva la temperatura de la reacción del complejo de hibridación diana y se mide la emisión del donante y se controla en un intervalo de temperaturas, formándose así una curva de fusión. Puede usarse un intervalo de temperatura de, por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 95 °C. De forma alternativa, el amplicón y el extintor soluble pueden comenzar a una temperatura elevada (por ejemplo, aproximadamente 95 °C), y la emisión del donante se controla mientras la temperatura de la reacción se reduce (por ejemplo, a aproximadamente 20 °C), generando así una curva de disociación-asociación.

10 En cualquier de los casos de una curva de disociación-asociación o una curva de fusión, la emisión medida del donante se correlaciona con un valor de asociación/disociación del dúplex particular, y se deriva una  $T_m$  en la que  $T_m$  es aquella temperatura a la que una mitad de una población de complejos de hibridación se disocia en hebras simples.

15 Ejemplos de determinaciones de la  $T_m$  que usan modificadores solubles de la emisión de luz y ácidos nucleicos marcados monocatenarios pueden encontrarse, por ejemplo, en los ejemplos 19-22 de la publicación de patente de EE. UU. N.º 2007/0020664, publicada el 25 de enero de 2007, correspondiente al documento EP 1 739 190.

### **VII. Mezclas de reacción**

25 Las mezclas de reacción típicamente incluyen cantidades seleccionadas de modificadores de la emisión de luz y oligonucleótidos marcados, como se describe en el presente documento. Además, las mezclas de reacción también incluyen, en general, diversos reactivos que son útiles en la realización de reacciones de amplificación o detección de ácidos nucleicos, tales como el control de la PCR en tiempo real. Ejemplos de reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos cebadores, ácidos nucleicos molde o diana, nucleótidos que incorporan biocatalizadores (por ejemplo, ADN-polimerasas, etc.), nucleótidos extensibles, nucleótidos terminadores, 30 tampones, sales, amplicones, glicerol, iones metálicos, dimetilsulfóxido (DMSO), poli rA (un ácido nucleico vehículo para dianas de copia baja) y similares. El nucleótido que incorpora biocatalizadores (por ejemplo, ADN-polimerasas) en las mezclas de reacción puede tener o carecer de diversas actividades (por ejemplo, actividad nucleasa 5' → 3'), siempre y cuando el biocatalizador sea capaz de extender un cebador en una reacción de amplificación en condiciones de amplificación adecuadas. En algunos modos de realización, por ejemplo, se realizan reacciones de 35 amplificación de ácidos nucleicos utilizando estas mezclas de reacción para efectuar la detección de ácidos nucleicos diana en muestras, por ejemplo, para ayudar en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades.

40 Las mezclas de reacción se producen, en general, combinando modificadores de la emisión de luz seleccionados y oligonucleótidos marcados con cantidades de los reactivos de amplificación de ácido nucleico que son suficientes para realizar el procedimiento de amplificación de ácido nucleico particular seleccionado. Las cantidades de reactivos de amplificación de ácido nucleico que deben incluirse en una mezcla de reacción dada son bien conocidas por los expertos en la técnica en vista del procedimiento de amplificación de ácido nucleico seleccionado. Sin embargo, a título ilustrativo, los ácidos nucleicos cebadores y los nucleótidos extensibles (por ejemplo, cuatro dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) están presentes en un gran exceso molar en las mezclas de reacción en ciertos 45 modos de realización. En el presente documento se describen en ácidos nucleicos sonda y cebadores que pueden utilizarse en las mezclas de reacción. Los nucleótidos extensibles adecuados están fácilmente disponibles de muchos proveedores comerciales diferentes, incluyendo, por ejemplo, Roche Diagnostics Corporation (Indianápolis, IN, EE. UU.), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, EE. UU.), Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.) y similares.

50 Los nucleótidos que incorporan biocatalizadores utilizados en los procedimientos de la invención típicamente comprenden enzimas, tales como polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido-fosforilasas y similares. En ciertos modos de realización, por ejemplo, la enzima incluye una actividad nucleasa 5'-3', una actividad exonucleasa 3'-5' y/o es una enzima termoestable. La enzima se deriva opcionalmente de un microorganismo, tal como *Thermus antranikianii*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus rubber*, *Thermus rubens*, *Thermus scatoductus*, *Thermus silvanus*, la especie *Thermus sps* 17, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Anaerocellum thermophilum*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus* o similares.

60 En ciertos modos de realización, también se añaden reactivos adicionales a las mezclas de reacción. A título ilustrativo, las mezclas de reacción también incluyen opcionalmente pirofosfatasa (por ejemplo, una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo, para usar en la minimización de la pirofosforólisis, dUTP y uracilo *N*-glicosilasa (UNG) (por ejemplo, UNG termoestable), por ejemplo, para proteger contra la contaminación por arrastre, y similares.

65 En algunos modos de realización, la mezcla de reacción comprende al menos un ácido nucleico diana y:

- 5 (1) al menos un oligonucleótido marcado que comprende un primer marcador, comprendiendo dicho primer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, de tal manera que el oligonucleótido marcado hibrida con el ácido nucleico diana en una condición seleccionada;
- 10 al menos un modificador soluble de la emisión de luz, que, cuando el modificador se une al ADN bicatenario que incorpora el oligonucleótido marcado, altera (por ejemplo, extingue) la emisión de luz del primer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del primer marcador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz cuando el oligonucleótido marcado es monocatenario; y
- 15 un primer polinucleótido del amplicón mono o bicatenario, en el que el primer polinucleótido del amplicón comprende (por ejemplo, en el extremo 5' de una hebra del amplicón) el marcador y la secuencia del oligonucleótido marcado; y opcionalmente
- 20 (2) un segundo oligonucleótido marcado que comprende un segundo marcador, comprendiendo dicho segundo marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del segundo oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una segunda subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el segundo oligonucleótido marcado hibrida con el segundo ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal del segundo marcador puede distinguirse de la señal del primer marcador (y, si están presentes, el tercer y cuarto marcador),
- 25 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el segundo oligonucleótido marcado, altera (por ejemplo, extingue) la emisión de luz del segundo marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del segundo marcador cuando el segundo oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz; y
- 30 un segundo polinucleótido del amplicón mono o bicatenario, en el que el segundo polinucleótido del amplicón comprende (por ejemplo, en el extremo 5' de una hebra del amplicón) el marcador y la secuencia del segundo oligonucleótido marcado; y opcionalmente
- 35 (3) proporcionar un tercer oligonucleótido marcado que comprende un tercer marcador, comprendiendo dicho tercer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del tercer oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una tercera subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el tercer oligonucleótido marcado hibrida con el tercer ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal de tercer marcador puede distinguirse de la señal del primer y segundo marcador,
- 40 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el tercer oligonucleótido marcado, altera (por ejemplo, extingue) la emisión de luz del tercer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del tercer marcador cuando el tercer oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz; y
- 45 un tercer polinucleótido del amplicón mono o bicatenario, en el que el tercer polinucleótido del amplicón comprende (por ejemplo, en el extremo 5' de una hebra del amplicón) el marcador y la secuencia del tercer oligonucleótido marcado; y opcionalmente
- 50 (4) proporcionar un cuarto oligonucleótido marcado que comprende un cuarto marcador, comprendiendo dicho cuarto marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del cuarto oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una cuarta subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el cuarto oligonucleótido marcado hibrida con el cuarto ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal de cuarto marcador puede distinguirse de la señal del primer, segundo y tercer marcador,
- 55 en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el cuarto oligonucleótido marcado, altera (por ejemplo, extingue) la emisión de luz del cuarto marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del cuarto marcador cuando el cuarto oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz; y
- 60 un cuarto polinucleótido del amplicón mono o bicatenario, en el que el cuarto polinucleótido del amplicón comprende (por ejemplo, en el extremo 5' de una hebra del amplicón) el marcador y la secuencia del cuarto oligonucleótido marcado.
- 65 En algunos otros modos de realización preferentes de acuerdo con la invención, hay al menos dos o más amplicones diferentes que comprenden la secuencia y el marcador de cualquiera de uno (o dos, tres o cuatro) de los oligonucleótidos marcados descritos anteriormente. Estos se generarían, por ejemplo, cuando dos moldes variantes

estuviesen en la mezcla de reacción y, por lo tanto, se generasen dos amplicones. En algunos modos de realización, en los que hay más de un amplicón generado a partir del mismo oligonucleótido marcado, las diferentes variantes de amplicón tienen una temperatura de fusión con al menos una diferencia de al menos 5 °C entre ellas, permitiendo de este modo la detección de cada una en un análisis de la curva de fusión.

5 En algunos modos de realización adicionales preferentes de acuerdo con la invención, los amplicones derivados de diferentes oligonucleótidos marcados comprenden al menos 5, 10, 15, 20 o más nucleótidos contiguos en común. En algunos modos de realización, los amplicones derivados de diferentes oligonucleótidos marcados se generan a partir de un gen o fuente vírica o bacteriana común (por ejemplo, cada amplicón es un ácido nucleico del HPV amplificado). En algunos de estos modos de realización, los amplicones derivados de diferentes oligonucleótidos marcados no comprenden al menos 5, 10, 15, 20 o más nucleótidos contiguos en común.

### **VIII. Kits**

15 Las mezclas de reacción o los componentes de las mismas (por ejemplo, cebadores y/o modificadores de la emisión de luz) empleados en los procedimientos de la presente invención se acondicionan opcionalmente en kits. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente acondicionados, necesarios para la hibridación, amplificación y detección de ácidos nucleicos diana, como tampones, enzimas, patrones de ADN, sales, iones metálicos, cebadores, nucleótidos extensibles o terminadores, glicerol, dimetilsulfóxido, Poli rA, etc., así como  
20 instrucciones para llevar a cabo un ensayo particular. Los componentes del kit, tales como sondas y modificadores de la emisión de luz, se proporcionan típicamente en uno o más envases. En algunos de estos modos de realización, los kits incluyen además al menos una pirofosfatasa (por ejemplo, una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo, para su uso en la minimización de la pirofosforólisis y/o uracilo *N*-glicosilasa (UNG), por ejemplo, para uso en aplicaciones donde es deseable la protección contra la contaminación por arrastre. Dos o más de los  
25 componentes del kit pueden estar acondicionados dentro del mismo envase.

### **IX. Sistemas**

30 En algunos modos de realización, la invención está relacionada con sistemas integrados para hacer determinaciones de la  $T_m$ . Los sistemas pueden incluir instrumentos y medios para interpretar y analizar datos recogidos, especialmente cuando los medios para derivar la  $T_m$  comprenden algoritmos y/o información almacenada electrónicamente (por ejemplo, datos de fluorescencia recogidos, correlaciones de la  $T_m$  predeterminadas, etc.). Cada parte de un sistema integrado puede estar funcionalmente interconectada y, en algunos casos, físicamente conectada. En algunos modos de realización, el sistema integrado es automatizado, en el que no hay necesidad de  
35 ninguna manipulación de la muestra o instrumentos por un operario después del inicio del análisis de la  $T_m$ .

Un sistema puede incluir instrumentos. Por ejemplo, un sistema puede incluir un detector tal como un detector de fluorescencia (por ejemplo, un espectrofotómetro de fluorescencia). Se puede usar un detector o detectores junto con la invención, por ejemplo, para controlar/medir la emisión desde el resto emisor de luz en la sonda de  $T_m$ . Un  
40 detector puede estar en forma de un lector de placas de pocillos múltiples para facilitar la capacidad de alto rendimiento del ensayo de  $T_m$ .

En algunos modos de realización, el sistema integrado incluye un dispositivo de termociclación, o termociclador, con el fin de controlar la temperatura del análisis de fusión de la  $T_m$ . En algunos modos de realización, el dispositivo de  
45 termociclación y el detector son un instrumento integrado, en el que la termociclación y la detección de emisiones (por ejemplo, detección de fluorescencia) se hacen en el mismo dispositivo.

Un detector, por ejemplo, un espectrofotómetro de fluorescencia, puede conectarse a un ordenador para controlar los parámetros de funcionamiento del espectrofotómetro (por ejemplo, longitud de onda de la excitación y/o longitud de onda de la emisión detectada) y/o para el almacenamiento de datos recogidos del detector (por ejemplo, mediciones de la fluorescencia durante un análisis de la curva de fusión). El ordenador también puede estar conectado operativamente al dispositivo de termociclación para controlar la temperatura, la temporización y/o la  
50 velocidad de cambio de temperatura en el sistema. El ordenador integrado puede contener también el «módulo de correlación» en el que se analizan los datos recogidos del detector y en el que se determina la  $T_m$  del complejo de hibridación diana (electrónicamente). En algunos modos de realización, el módulo de correlación comprende un programa informático que calcula la  $T_m$  basándose en las lecturas de fluorescencia del detector y, en algunos casos, opcionalmente deriva la información del genotipo vírico de una muestra basándose en el resultado de la  $T_m$ . En algunos modos de realización, el módulo de correlación compara la  $T_m$  de la muestra con una base de datos (o tabla) de valores de la  $T_m$  para tipos variantes conocidos (por ejemplo, variantes víricas conocidas, SNP conocidos, etc.) para establecer una correlación entre la  $T_m$  de la muestra desconocida y el genotipo variante de la muestra desconocida.  
60

En algunos aspectos, un sistema para la determinación de una  $T_m$  de un complejo de hibridación comprende una mezcla de reacción como se describe en el presente documento. El sistema también incluye un dispositivo de control  
65 térmico para regular la temperatura de la reacción de fusión en un intervalo de temperaturas, en el que el intervalo de temperaturas incluye una temperatura en la que esencialmente todas las moléculas sonda se asocian con la

diana de hibridación en un conjunto dado de condiciones de hibridación, una temperatura a la que el 50 % de los complejos de hibridación diana están disociados, y una temperatura a la que esencialmente ninguna molécula de sonda se asocia con la diana de hibridación y esencialmente no hay complejos de hibridación presentes en las condiciones de hibridación. El sistema puede incluir además un detector para medir la señal de la reacción de fusión en el intervalo de temperaturas; y también un módulo de correlación que está operativamente acoplado al detector y recibe mediciones de las señales en el intervalo de temperaturas, en el que el módulo de correlación correlaciona la intensidad de señal con la presencia de un complejo de hibridación que comprende la sonda y la diana de hibridación en mezcla con el modificador soluble de la emisión de luz como función de la temperatura, determinando de este modo la  $T_m$  del complejo de hibridación diana. En algunos aspectos, el resto emisor de luz en la sonda es un resto donador de FRET.

La invención está también relacionada con sistemas para detectar ácidos nucleicos diana. El sistema incluye uno o más oligonucleótidos marcados y uno o más modificadores de la emisión de luz como se describe en el presente documento. En ciertos modos de realización, los oligonucleótidos están dispuestos en un soporte sólido, mientras que, en otros, se proporcionan en uno o más recipientes, por ejemplo, para ensayos realizados en solución. El sistema también incluye al menos un detector (por ejemplo, un espectrómetro, etc.) que detecta ácidos nucleicos y/o amplicones de los mismos a partir de la muestra. Además, los sistemas también incluyen opcionalmente al menos un modulador térmico (por ejemplo, un dispositivo de termociclación, etc.) conectado operativamente al recipiente o soporte sólido para modular la temperatura en el recipiente o sobre el soporte sólido, y/o al menos un componente de transferencia de fluido (por ejemplo, un pipeteador automatizado, etc.) que transfiere fluido hacia y/o desde el recipiente o soporte sólido, por ejemplo, para realizar una o más técnicas de amplificación de ácido nucleico y/o ensayos de hibridación de ácido nucleico en el recipiente o en el soporte sólido.

Los detectores están típicamente estructurados para detectar señales detectables producidas, por ejemplo, en otro componente del sistema de ensayo dado o proximales a él (por ejemplo, en un recipiente, sobre un soporte sólido, etc.). Detectores de señal adecuados que se utilizan opcionalmente, o adaptados para uso, en el presente documento, detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, absorbancia, índice de refracción, luminiscencia, masa o similares. Los detectores controlan opcionalmente una o una pluralidad de señales en dirección 5' y/o en dirección 3' de la realización de, por ejemplo, una etapa de ensayo dada. Por ejemplo, los detectores controlan opcionalmente una pluralidad de señales ópticas, que corresponden en posición a resultados «en tiempo real». Ejemplos de detectores o sensores incluyen tubos fotomultiplicadores, matrices CCD, sensores ópticos, sensores de temperatura, sensores de presión, sensores de pH, sensores de conductividad, detectores de dispersión o similares. Ejemplos de detectores más específicos que se utilizan opcionalmente para llevar a cabo los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, detectores de dispersión de luz por resonancia, espectroscopios de emisión, espectroscopios de fluorescencia, espectroscopios de fosforescencia, espectroscopios de luminiscencia, espectrofotómetros, fotómetros y similares. También se describen detectores, por ejemplo, en Skoog et al, *Principles of Instrumental Analysis*, 5.ª edición, Harcourt Brace College Publishers (1998) y Currell, *Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality*, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

Los sistemas descritos también incluyen típicamente controladores que están conectados operativamente a uno o más componentes (por ejemplo, detectores, moduladores térmicos, componentes de transferencia de fluido, etc.) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Más específicamente, los controladores se incluyen, en general, como componentes separados o integrales del sistema que se utilizan, por ejemplo, para recibir datos de detectores, para efectuar y/o regular la temperatura en los recipientes, para efectuar y/o regular el flujo de fluido hacia o desde recipientes seleccionados, o similar. Los controladores y/u otros componentes del sistema están opcionalmente acoplados a un procesador, ordenador, dispositivo digital u otro dispositivo de información programados apropiadamente (por ejemplo, incluyendo un convertidor de analógico a digital o de digital a analógico según sea necesario), que funciona para ordenar el funcionamiento de estos instrumentos de acuerdo con instrucciones preprogramadas o introducidas por el usuario, recibir datos e información de estos instrumentos, e interpretar, manipular y notificar esta información al usuario. Los controladores adecuados son, en general, conocidos en la técnica y están disponibles de diversas fuentes comerciales.

Cualquier controlador u ordenador incluye opcionalmente un monitor, que es a menudo una pantalla de tubo de rayos catódicos («CRT»), una pantalla plana (por ejemplo, pantalla de cristal líquido de matriz activa, pantalla de cristal líquido, etc.) u otros. Los circuitos del ordenador a menudo se colocan en una caja, que incluye numerosos chips de circuitos integrados, tales como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz y otros. La caja también incluye opcionalmente una unidad de disco duro, una unidad de disquete, una unidad extraíble de alta capacidad, como un CD-ROM grabable, y otros elementos periféricos comunes. Dispositivos de entrada, tales como un teclado o un ratón, permiten opcionalmente la entrada de datos por un usuario. Estos componentes se ilustran además a continuación.

El ordenador incluye típicamente un programa informático apropiado para recibir instrucciones del usuario, ya sea en forma de datos introducidos por un usuario en un conjunto de campos de parámetros, por ejemplo, en una GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo, preprogramadas para una variedad de operaciones específicas diferentes. A continuación, el programa informático convierte estas instrucciones en un lenguaje apropiado para ordenar el funcionamiento de uno o más controladores para llevar a cabo la operación deseada. El

ordenador recibe entonces los datos de, por ejemplo, sensores/detectores incluidos en el sistema, e interpreta los datos, o los proporciona en un formato comprendido por el usuario o los utiliza para iniciar instrucciones del controlador adicionales, de acuerdo con la programación, por ejemplo, tales como controlar reguladores de flujo de fluido en respuesta a los datos del peso de fluido recibidos de balanzas o similares.

5

EJEMPLO

**Materiales y procedimientos para fusión de amplicones con nuevo azul de metileno**

10 **Cebadores**

Este ensayo utilizó únicamente cebadores marcados específicamente con genotipos, sin sondas. Los cebadores se marcan, en general, con FAM, HEX, JA270 o Cy5.5 en el extremo 5' del cebador en dirección 5', en dirección 3' o ambos. También se pueden utilizar cebadores con un marcador interno. Los cebadores son, en general, 16 pares de bases o más, y están diseñados para generar amplicones de longitud y temperatura de fusión variables.

15

**Mezcla madre**

Se añadió nuevo azul de metileno a la mezcla madre de PCR como extintor líquido a 0,00625 µg/µl. Se usó polimerasa Gold Z05 a una concentración final de 60 U. Se usaron cebadores en dirección 5' y en dirección 3' en cantidades iguales de 0,25 µM cada uno.

20

**PCR y perfil de fusión**

El experimento se realizó en un Z480 con el siguiente perfil. Etapa 1, 50 °C durante 2 min; etapa 2, 95 °C durante 9 min; etapa 3, 95 °C durante 30 s, seguido de 55 °C durante 45 s x 60 ciclos; etapa 4, 95 °C durante 10 s, seguido de 40 °C durante 2 min y 90 °C, 3 adquisiciones en continuo por °C.

25

**Explicación de los gráficos**

30

**HEX45 y HEX16**

Los tipos de HPV 45 y 16 se realizaron en las condiciones mencionadas anteriormente. Véase figura 1. A1: HEX45 representa cebadores HPV45 marcados con HEX en el extremo 5' de un cebador y amplificados en un fondo de plásmido HPV45. C1: 16HEX son cebadores HPV16 marcados internamente con colorante HEX sobre un cebador y amplificados en un fondo de plásmido HPV16. E11: HEX16/45 + FAM31/39 son cebadores HPV 16, 45, 31 y 39 combinados y amplificados en un fondo de plásmidos HPV16, 45, 31 y 39. B2 y D2 no son controles molde.

35

**Resultados**

40

Son visibles picos de fusión en HPV16 y 45 a las Tm correctas cuando se multiplexan con los cebadores marcados con FAM.

**FAM31 y FAM39**

45

Los tipos de HPV 31 y 39 se realizaron en las condiciones anteriores. Véase figura 1. E3: FAM31 representa cebadores HPV31 marcados con FAM en el extremo 5' de un cebador y amplificados con plásmido HPV31. G1: FAM39 son cebadores HPV39 marcados con FAM en el extremo 5' de un cebador y amplificados con plásmido HPV39. E11: HEX HEX16/45 + FAM31/39 son cebadores HPV16, 45, 31 y 39 combinados y amplificados en un fondo de plásmidos HPV16, 45, 31 y 39. F2 y H2 no son controles molde.

50

**Resultados**

HPV 31 y 39 tienen distintos picos de fusión cuando se amplifican por separado. Sin embargo, las Tm que son picos de fusión están muy cerca, de modo que cuando se coamplifican da lugar a un pico pequeño y ancho. Aunque dos picos distintos son el resultado preferente, este pico ancho es una característica distintiva única de la presencia de estos dos tipos de HPV.

55

**Resultados generales para I multiplex**

60

Las tecnologías actuales sugieren que cuatro amplicones diferentes por canal podrían fundirse en el intervalo de 68 °C a 83 °C para producir un total de 16 fundidos en un sistema de cuatro canales o 20 fundidos en un sistema de cinco canales.

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una variante del ácido nucleico diana en una muestra, en el que puede producirse un ácido nucleico diana en al menos dos variantes, comprendiendo el procedimiento

(a) proporcionar al menos un oligonucleótido marcado que comprende un primer marcador, comprendiendo dicho primer marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, de tal manera que el oligonucleótido marcado hibrida con el ácido nucleico diana en una condición seleccionada;

(b) proporcionar al menos un modificador soluble de la emisión de luz, que, cuando el modificador se une de forma no covalente al ADN bicatenario que incorpora el oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del primer marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del primer marcador en presencia del modificador soluble de la emisión de luz cuando el oligonucleótido marcado es monocatenario;

(c) amplificar el ácido nucleico diana en la muestra en presencia del oligonucleótido marcado y del modificador soluble de la emisión de luz en una reacción de amplificación en la condición seleccionada, de tal manera que el oligonucleótido marcado se extienda para producir un primer amplicón marcado bicatenario que incorpore el oligonucleótido marcado, en el que el primer amplicón marcado bicatenario tenga una temperatura de fusión diferente dependiendo de cuál de las al menos dos variantes del ácido nucleico diana se amplifican;

(d) detectar la temperatura de fusión del amplicón marcado bicatenario disociado en dos hebras individuales monitorizando la señal del marcador con una temperatura cambiante; y

(e) correlacionar la temperatura de fusión del amplicón marcado bicatenario con la presencia de una de las al menos dos variantes diana, detectando de este modo la presencia o ausencia de una variante del ácido nucleico diana en una muestra.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además

proporcionar un segundo oligonucleótido marcado que comprende un segundo marcador, comprendiendo dicho segundo marcador al menos un resto emisor de luz y en el que al menos una subsecuencia del segundo oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria de al menos una segunda subsecuencia del ácido nucleico diana que puede presentarse en al menos dos variantes, de manera que el segundo oligonucleótido marcado hibrida con el segundo ácido nucleico diana en la condición seleccionada y en el que la señal del segundo marcador puede distinguirse de la señal del primer marcador,

en el que al menos un modificador soluble de la emisión de luz, cuando se intercala en ADN bicatenario que incorpora el segundo oligonucleótido marcado, extingue la emisión de luz del segundo marcador y no extingue significativamente la emisión de luz del segundo marcador cuando el segundo oligonucleótido marcado es monocatenario, en presencia del modificador soluble de la emisión de luz;

en el que la muestra comprende al menos una variante del ácido nucleico diana y la etapa de amplificación (c) comprende además amplificar el ácido nucleico en la muestra en presencia del segundo oligonucleótido marcado en la reacción de amplificación, de manera que el segundo oligonucleótido marcado se extienda para producir un segundo amplicón marcado que incorpore el segundo oligonucleótido marcado, y en el que el segundo amplicón marcado tenga una temperatura de fusión diferente dependiendo de cuál de las al menos dos variantes del ácido nucleico diana se amplifiquen;

en el que la etapa de detección (d) comprende además detectar la temperatura de fusión del segundo amplicón marcado monitorizando la señal del segundo marcador con una temperatura cambiante; y

en el que la etapa de correlación (e) comprende además correlacionar la temperatura de fusión del segundo amplicón marcado con la presencia de una segunda variante del ácido nucleico diana.

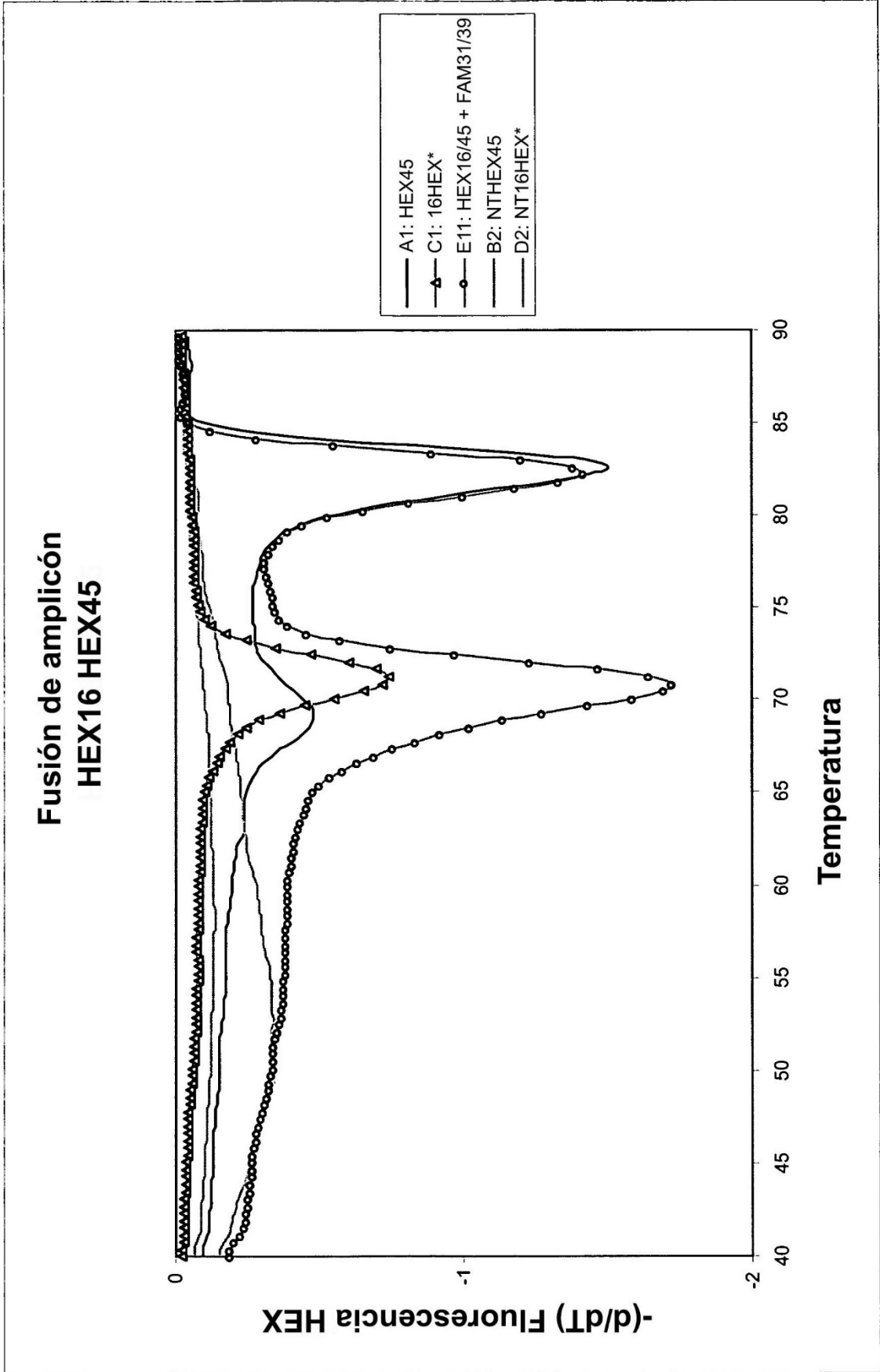
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el modificador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de diazina, uncolorante de tiazina, un colorante de azocarmina, un colorante de fenazina, un colorante de oxazina, cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina, azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, azul de sim-dimetiltionina, azul de toluidina O, nuevo azul de metileno, violeta de metileno berntsen, azul A, azul B y azul celeste.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el primer y/o el segundo marcador se selecciona del grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína y un colorante de cianina.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano, animal, oncogénico, bacteriano o vírico.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las temperaturas de fusión de los amplicones de las al menos dos variantes difieren en al menos 5 grados C.



Figura 1



24019 PRO-S005

12

Figura 2

