

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 631**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/US2014/036515**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14727339 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2997161**

54 Título: **PCR digital en gotas con sondas cortas de ranura menor**

30 Prioridad:

13.05.2013 US 201361822786 P

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**ELITECHGROUP B.V. (100.0%)
Van Rensselaerweg 4
6956 AV Spankeren, NL**

72 Inventor/es:

BELOUSOV, YEVGENIY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 654 631 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

PCR digital en gotas con sondas cortas de ranura menor

5 La presente invención hace referencia a técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital, y más específicamente a la detección de amplicones generados por un ensayo ddPCR mediante sondas cortas de ligando-fluoróforo-oligonucleótido-extintor (MGB-FI-oligo-Q) del surco menor.

Antecedentes

10 En la PCR en tiempo real, la información cuantitativa se obtiene del umbral de ciclo (Cq), un punto donde la señal de la curva de fluorescencia aumenta por encima del fondo. Se requieren calibradores externos para calcular la concentración de muestras no conocidas. La variación en la eficacia de la amplificación afecta los valores de Cq, lo que a su vez limita la precisión de las técnicas para una cuantificación absoluta. Se reconoce que la combinación de la dilución limitante, PCR de punto final (del inglés "end-point"), y estadística de Poisson puede determinar la medida absoluta de la concentración de ácidos nucleicos (Vogelstein y Kinzler, Patente de EE.UU. N° 6,440,706).

15 El análisis del polimorfismo de un único nucleótido (SNP) ha sido desarrollado para amplificar una única plantilla de un conjunto de muestras de ADN, generando de ese modo amplicones que son homogéneos en cuanto a la secuencia. Se utilizan diferentes sondas marcadas con fluorescencia para detectar y discriminar diferentes alelos (por ejemplo, alelos paternos vs. maternos o alelos de tipo silvestre vs. mutantes), que pueden contarse fácilmente. Las ventajas de la PCR digital han sido descritas (Chang y Shih). Actualmente, existen básicamente dos sistemas de PCR digital disponibles comercialmente. El primero utiliza cámaras microfluidas o micropocillos para dividir muestras en alícuotas del orden de cientos de nanolitros. El segundo sistema implica PCR en emulsión, en donde las plantillas se amplifican por clonación en presencia de perlas que se recuperan de la emulsión, a continuación se hibridan con una sonda de hibridación y se leen mediante citometría de flujo convencional. Estas aproximaciones son idealmente adecuadas para el análisis del polimorfismo de un único nucleótido y para la detección del desequilibrio alélico (Hindson, Tsui). Se han utilizado diferentes sondas para la detección de amplicones generados por PCR digital, por ejemplo, balizas moleculares (Pat. De EE.UU. N° 6,440,706) y sondas MGB TaqMan y con doble marca no-MGB TaqMan probes (Hindson). Habitualmente, estas sondas son mayores de 25 16 bases. Las sondas TaqMan son escindidas por polimerasas con actividad 5'-exonucleasa. En algunas aplicaciones, se utiliza la PCR digital en gotas (ddPCR) para realizar mediciones de ADN sumamente precisas, por ejemplo ADN del VIH (Cepa).

30 Se realiza la PCR digital a punto-final (35-45 ciclos) en un termociclador convencional. Se introducen muestras y aceite en un generador de gotas y se cargan en una placa de PCR de 96 pocillos. Se colocan gotas de cada pocillo en un lector que las desplaza en una única fila pasándolas por un detector fluorescente a temperatura ambiente. Aunque la PCR digital muestra una amplia mejora en la precisión y la sensibilidad, las sondas de mayor longitud tienden a hibridar de forma no específica.

35 Se han divulgado sondas de ligando-fluoróforo-oligonucleótido-extintor (MGB-FI-oligo-Q) de surco menor en las Patentes de EE.UU. Nos. 7,381,818 y 7,759,126, pero no se ha divulgado la detección de amplicones generados con ddPCR a temperatura ambiente con estas sondas cortas. La WO 03/062445 divulga sondas Eclipse compuestas de oligonucleótidos de 8-25 nucleótidos de longitud y utiliza los mismos para discriminar variantes alélicas de ácido nucleico.

Resumen

40 La presente invención pertenece a la detección de amplicones generados por ensayo ddPCR mediante sondas cortas de ligando-fluoróforo-oligonucleótido-extintor (MGB-FI-oligo-Q) de surco menor.

45 Las sondas cortas de MGB-FI-oligo-Q funcionan inesperadamente bien como sondas de detección. Las sondas cortas MGB-FI-oligo-Q no solamente reducen el ruido de fondo, sino que también muestran una mejora en la discriminación de desapareamiento de bases en comparación con sondas no-MGB de la misma longitud para detectar las dianas generadas por ddPCR a temperatura ambiente (~22 °C).

Las sondas cortas MGB-FI-oligo-Q funcionan inesperadamente bien en la discriminación de alelos, permitiendo la detección de baja abundancia de alelos contra un fondo de una alta concentración de alelos mutantes. Las sondas cortas de oligonucleótidos de ligando de ranura menor también permiten la determinación del número de copias de la línea germinal.

50 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente patente.

5 La Figura 1 muestra las curvas de fusión en bruto de una sonda de MGB-FI-oligo-Q de 10-mer y una sonda no-MGB de 10-mer en el canal FAM (A) y en el canal Vic (B) hibridadas a una diana sintética;

La Figura 2 muestra un diagrama de dispersión de fluorescencia de las sondas MGB-FI-oligo-Q de 10 mer (Seq ID Nos. 1 y 2) y la sonda no-MGB de 10-mer (Seq ID Nos. 3 y 4), hibridadas a dianas sintéticas que contienen alelos "A" y "C" (Seq ID Nos. 5 y 6);

10 La Figura 3 muestra un diagrama de dispersión de fluorescencia de sondas de MGB-FI-oligo-Q de 10-mer (Seq ID Nos. 1 y 2), 11-mer (Seq ID Nos. 7 y 8) y 16/17-mer (Seq ID Nos. 9 y 10), hibridadas a dianas sintéticas que contienen alelos "A" y "C" (Seq ID Nos. 5 y 6);

15 Las Figuras 4a), 4b) y 4c) muestran, respectivamente, los diagramas de dispersión de detección fluorescente con sondas TaqMan con doble marca de 30-mer (Seq ID Nos. 11 y 12), sondas MGB-FI-oligo-Q de 16/17-mer (Seq ID Nos. 9 y 10) y sondas MGB-FI-oligo-Q probe de 10-mer (Seq ID Nos. 1 y 2) de alelo amplificado por ddPCR rs 121912462 en el gen APC a temperatura ambiente; y

La Figura 5 muestra los diagramas de dispersión de la detección fluorescente con sondas MGB-FI-oligo-Q de 10-mer (Seq ID Nos. 15 y 16) de alelo amplificado por ddPCR rs 121913529 en el gen KRAS a temperatura ambiente.

Descripción detallada

20 La presente invención hace referencia a técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital en gotas, y más específicamente a la detección de amplicones generados por un ensayo ddPCR mediante sondas cortas de ligando-fluoróforo-oligonucleótido-extintor (MGB-FI-oligo-Q) de surco menor.

I. Definiciones

A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos y frases tienen los significados que se proporcionan a continuación:

25 El término "secuencia diana" hace referencia a una secuencia en ARN diana, o ADN que es parcialmente o completamente complementario a la cadena madura. La secuencia diana puede describirse utilizando las cuatro bases de ADN (A, T, G, y C), o las cuatro bases de ARN (A, U, G, y C).

30 El término "complementario" hace referencia a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de base entre sí. Los pares de base se forman habitualmente por enlaces de hidrógeno entre unidades de nucleótidos en cadenas de polinucleótidos antiparalelas. Las cadenas de polinucleótidos complementarias pueden formar pares de bases de la forma establecida por Watson-Crick (por ejemplo, A con T, A con U, C con G), o de cualquier otra manera que permita la formación de dúplex, incluyendo el par de base con titubeo formado entre U y G. Como conocen bien las personas expertas en el arte, cuando se utiliza ARN en oposición al ADN, es uracilo en lugar de timina la base que se considera complementaria a la adenosina. Sin embargo, cuando un U se indica en el contexto de la presente invención, está implicada la capacidad de sustituir a T, a menos que se indique de otro modo. Las bases modificadas por inosina de la solicitud en tramitación hibridan con estabilidades similares a las de los pares de base normales.

40 El término "sustancialmente" complementario hace referencia a la capacidad de un oligonucleótido para formar pares de base específicamente con otro oligonucleótido, donde dicho oligonucleótido puede contener uno o más desapareamientos de bases.

45 El término "dúplex" hace referencia a una estructura de doble cadena formada por dos polinucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, incluyendo pares de base de tipo Watson-Crick y pares de base U-G con titubeo que permiten una estructura de doble cadena estabilizada entre cadenas de polinucleótidos que son al menos parcialmente complementarios. Las cadenas de un dúplex no necesitan ser perfectamente complementarias para que se forme un dúplex, es decir, un dúplex puede incluir uno o más desapareamiento de bases. Además, los dúplex pueden formarse entre dos regiones complementarias dentro de una única cadena (por ejemplo, una horquilla (del inglés "hairpin")).

50 El término "nucleótido" hace referencia a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada del mismo, además de un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos, además de pirimidinas, por ejemplo, citosina, uracilo,

timina, y sus derivados y análogos. Entre los análogos de nucleótidos se incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, azúcar y/o fosfato, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas de la citosina, y sustitución de 5-bromo-uracilo; y modificaciones de azúcar en la posición 2', incluyendo pero sin limitarse a, ribonucleótidos modificados con azúcar en los que el 2'-OH se reemplaza por un grupo tal como H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, o CN, en donde R es una fracción alquilo. Análogos de nucleótidos también pretenden incluir nucleótidos con bases tales como inosina, queuosina, xantina, azúcares tales como 2'-metil ribosa, enlaces fosfodiéster no-naturales tales como en etilfosfonatos, fosforotioatos y péptidos.

El término "bases modificadas" hace referencia a aquellas bases que difieren de las bases de origen natural (adenina, citosina, guanina, timina, y uracilo) mediante adición o delección de uno o más grupos funcionales, diferencias en la estructura de anillo heterocíclico (es decir, sustitución de carbono para un heteroátomo, o vice versa), y/o unión de una o más estructuras de brazo conector a la base. Los nucleótidos modificados preferidos son aquellos basados en una estructura de pirimidina o una estructura de purina, donde la última es preferiblemente 7 deazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas (descritas en la PCT WO 01/84958); y también descritas en la Patente de EE.UU. N° 6,127,121. Las bases modificadas preferidas son pirimidinas sustituidas en la posición 5 y pirazolopirimidinas sustituidas en la posición 3. Ejemplos de bases modificadas preferidas son 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (PPG o Súper G®), 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, 1H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H)-6(7H)-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-ini)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetinil)pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidina-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidina-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-ini)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-ini)-1,3-dihidropirimidina-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (Súper A®), 6-Amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidina-2,4-diona (Súper T), 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina, 3-Bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina.

Los términos "bases universales" y "bases degenerativas" hacen referencia a análogos de bases naturales que son capaces de formar pares de base con dos o más bases naturales en ADN o ARN con poca discriminación entre ellas. Las bases naturales y degenerativas son bien conocidas en el arte y se divulgan en la Patente de EE.UU. N° 7,348,146. Los conjugados de oligonucleótidos que contienen un análogo de inosina de la actual divulgación pueden también comprender una o más bases universales y degenerativas, además de las bases de origen natural adenina, citosina, guanina, timina y uracilo.

El término "nucleótido" también pretende incluir lo que se conoce en el arte como bases universales. A modo de ejemplo, las bases universales incluyen, pero no se limitan a, 3-nitropirrola, 5-nitroindolo, o nebularina. Las 3-alquil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-onas funcionalizadas como bases universales para A, C, T o G se divulgaron en la solicitud de EE.UU. 12/0244535.

El término "nucleótidos" también pretende incluir la fosforamidita N3' a P5', que son el resultado de la sustitución de un ribosil 3'-oxígeno con un grupo amino. Además, el término nucleótido también incluye aquellas especies que tienen una marca detectable, tal como por ejemplo, una fracción radioactiva o fluorescente, o etiqueta en masa unidas al nucleótido.

El término "conector" hace referencia a una fracción que se utiliza para ensamblar diversas partes de la molécula o unir de forma covalente la molécula (o partes de la misma) a un soporte sólido. Adicionalmente, un conector puede incluir partes lineales o acíclicas, partes cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos.

Se ha observado que los "colorantes fosfonato o fosfonilados" (por ejemplo, colorantes que tienen un grupo fosfonato zwitteriónico (híbrido) o una forma protegida del mismo), además de reactivos que incorporan esos colorantes (por ejemplo, colorantes y fosforamiditas enlazadas a un soporte), son compatibles con, por ejemplo, colorantes de cumarina, colorantes de benzocumarina, colorantes de fluoresceína, colorantes rodol, colorantes fenoxazina, colorantes de benzofenoxazina, colorantes de xanteno, colorantes de benzoxanteno, y colorantes de cianina (patente de EE.UU. Nos. 7,671,218, 7,67,834, 8,008,522, 8,389,745 y 8,163,910).

Ejemplos de estos y de otras clases de colorantes adecuados pueden encontrarse en Haugland, et al., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Ed., Molecular Probes, Eugene, Ore. 1996; Patentes de EE.UU. Nos. 3,194,805; 3,128,179; 5,187,288; 5,188,934; 5,227,487; 5,248,782; 5,304,645; 5,433,896; 5,442,045; 5,556,959; 5,583,236; 5,808,044; 5,852,191; 5,986,086; 6,020,481; 6,162,931; 6,180,295; and 6,221,604; EP

1408366; Smith, et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1993, 1195-1204; Whitaker, et al., Anal. Biochem. 207:267-279 (1992); Krasovskii and Bolotin, Organic Luminescent Materials, VCH Publishers, NY., 1988; Zolliger, Color Chemistry, 2ª Edición, VCH Publishers, NY., 1991; Hirschberg, et al., Biochemistry 37:10381-10385 (1998); Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, Volúmenes 1 a 17, Wiley, EE.UU., 1995. Geiger, et al., Nature 359:859-861 (1992). Aún otros colorantes se proporcionan online a través de sitios tales como <http://www.zeiss.com>.

Existe una guía extensa en el arte para seleccionar pares de extintores y fluoróforos y su unión a oligonucleótidos (Haugland, 1996; Patentes de EE.UU. Nos. 3,996,345 y 4,351,760 y similares). Los extintores preferidos se describen en la Patente de EE.UU. N° 6,727,356. Otros extintores incluyen extintores biz azo (Patente de EE.UU. N° 6,790,945) y colorantes de Biosearch Technologies, Inc. (proporcionados como Black Hole™ Extintores: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcyl, TAMRA y carboxitetrametil rodamina.

Los conjugados (o "sondas") de oligonucleótidos de ligando de unión al surco menor han sido descritos (véase la patente de EE.UU. N° 5,801,155 y Patente de EE.UU. N° 6,312,894.). Estos conjugados forman dúplex hiperestabilizados con ADN complementario. En particular, la especificidad de secuencia de las sondas de ligandos de unión al surco menor es excelente para aplicaciones a temperatura elevada, tales como la PCR. Las sondas/conjugados de la presente divulgación pueden además tener un ligando de unión al surco menor unido de forma covalente. Una variedad de ligandos de unión al surco menor adecuados han sido descritos en la literatura. Véase por ejemplo, Kutayavin, et al. Patente de EE.UU. N° 5,801,155; Wemmer, D.E., y Dervan P.B., Current Opinon in Structural Biology, 7:355-361 (1997); Walker, W.L., Kopka, J.L. y Goodsell, D.S., Biopolymers, 44:323-334 (1997); Zimmer, C & Wahnert, U. Prog. Biophys. Molec. Bio. 47:31-112 (1986) y Reddy, B.S.P., Dondhi, S.M., y Lown, J. W., Pharmacol. Therap., 84:1-111 (1999).

Los métodos adecuados para unir ligandos de unión al surco menor (además de grupos indicadores tales como bases modificadas, fluoróforos y extintores) a través de conectores a oligonucleótidos, se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. RE 38,416; 5,512,677; 5,419,966; 5,696,251; 5,585,481; 5,942,610 y 5,736,626.

Una enzima de procesamiento de nucleótido mono-fosfato, nucleótido di-fosfato o nucleótido trifosfato es una enzima que utiliza un nucleótido mono-fosfato, nucleótido di-fosfato o un nucleótido trifosfato como uno de sus sustratos. Una enzima de procesamiento de ácido nucleico de nucleótido mono-fosfato, nucleótido di-fosfato o nucleótido trifosfato cataliza modificaciones en los ácidos nucleicos o en intermedios del ácido nucleico utilizando ya sea un nucleótido mono-fosfato, nucleótido di-fosfato o un nucleótido trifosfato como uno de los sustratos. Las enzimas de nucleótido mono-fosfato, nucleótido di-fosfato o nucleótido trifosfato incluyen pero no se limitan a enzimas de extensión de cebadores, ADN polimerasas, ARN polimerasas, enzimas de restricción, enzimas de escisión, enzimas de reparación o ligación.

La síntesis de análogos de pirazolopirimidina-monofosfato y pirazolopirimidina-trifosfato ha sido divulgada en la Patente de EE.UU. N° RE 38,416.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales en química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácido nucleico, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante, secuenciación, secuenciación de segunda generación y campos relacionados tal como se encuentran dentro del arte experto. Estas técnicas se explican totalmente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lee H et al., Methods Mol. Biol. 855: 155-74 (2012); Ausubel, et al., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press (1991).

Los procedimientos de amplificación son aquellos en los que muchas copias de una secuencia de ácido nucleico diana se generan, habitualmente de forma exponencial, mediante reacciones de polimerización y/o secuencial. Además de las reacciones de amplificación más tradicionales discutidas a continuación, la presente invención es de utilidad en amplificaciones que implican uniones de tres vías (WO 99/37085), amplificación de señal (véase, Capaldi, et al., Nuc. Acids Res., 28:E21 (2000)), polimerasas T7, transcriptasa inversa, RNasa H, RT-PCR, círculos rodantes, enzima cleavasa y similar. Los métodos de amplificación isotérmicos han sido revisados (cc Niemz, A. et al Trends Biotechnol., 29: 240-50 (2011)). El término "cebadores de oligonucleótidos adyacentes a una región de sonda" hace referencia a cuando 0 o una o más bases separan el cebador y la sonda. La expresión "que se solapa con dicha región de sonda" se define como se revela en la patente de EE.UU. n° 7,319,022. El término "Ct" o "Cq" hace referencia al número de ciclo de PCR fraccional al que la fluorescencia indicadora es mayor que el umbral.

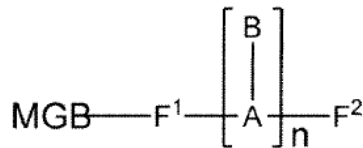
Muchas reacciones de amplificación, tales como la PCR, utilizan reacciones de polimerización dependientes del cebador reiterativas. Un cebador es un ácido nucleico que es capaz de hibridar con un segundo ácido nucleico plantilla y que, una vez hibridado, es capaz de ser extendido mediante una enzima de polimerización (en presencia de sustratos de nucleótidos), utilizando el segundo ácido nucleico como una plantilla. Las enzimas de polimerización incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN polimerasas y transcriptasas inversas. Las condiciones favorables para la

5 polimerización mediante diferentes enzimas de polimerización son bien conocidas para los expertos en el arte. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., supra; Ausubel, et al., supra; Innis et al., supra. En general, para hacer extensible mediante una enzima de polimerización, un cebador debe tener desbloqueado un extremo 3', preferiblemente un grupo hidroxilo 3' libre. El producto de una reacción de amplificación es un cebador extendido, en donde el cebador ha sido extendido mediante una enzima de polimerización.

II Descripción

10 En una realización, la presente invención comprende un método para discriminar desapareamiento de bases en una muestra de ADN diana, que comprende poner en contacto la muestra de ADN diana con una sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor; y detectar una señal fluorescente de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor. En determinadas realizaciones, la parte de oligonucleótidos de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor, tiene una secuencia complementaria a la región de la muestra de ADN diana, en la que se localiza el desapareamiento. En determinadas realizaciones, una parte de oligonucleótidos de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor, tiene una secuencia complementaria a una región de la muestra de ADN diana, en donde la muestra de AND diana, es ADN amplificado digitalmente que es el resultado de una reacción de ddPCR.

La sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor de la presente invención puede tener la fórmula:



20 en la que MGB M es un ligando de unión al surco menor; $\text{F}^1 = \text{F}^2$ es un fluoróforo o un extintor con la condición de que F^1 y F^2 no puedan ser ambos extintores o ambos fluoróforos; y $[\text{A-B}]_n$ representa un oligómero de ácido nucleico con n unidades, en donde n es un número entero de 9 a 11. Cada A independientemente representa un componente de cadena principal de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en una cadena principal de fosfato de azúcar, una cadena principal de fosfato de azúcar modificada, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, una cadena principal peptídica o una variante de la misma utilizada en la preparación de ácido nucleico; y cada B independientemente representa una base de ácido nucleico, una base modificada, o un análogo de base o una base universal o promiscua (indiscriminada) y la parte de oligonucleótido tiene una secuencia complementaria a una parte de la secuencia diana que está siendo amplificada en la PCR digital, y proporciona una mezcla.

En algunas realizaciones las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor, hibrida con una diana amplificada digitalmente a temperatura ambiente, o entre aproximadamente 20°C a 25°C, o aproximadamente a 22°C.

30 En algunas realizaciones las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor pueden ser utilizadas en la determinación del número de copias de la línea germinal.

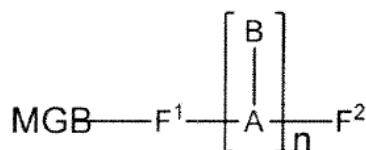
En algunas realizaciones, las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor pueden ser utilizadas en la detección de una mutación rara en un gran exceso de un fondo de tipo silvestre.

35 En algunas realizaciones el extintor tiene un espectro de absorción de entre aproximadamente 400 a 800 nm y el fluoróforo tiene una emisión de entre aproximadamente 400 a 800 nm.

En otra realización, las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor comprende al menos una B independientemente seleccionada de entre una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base o una base universal o promiscua. Son bases modificadas preferidas, Super G, Super A, Super T y Super inosina.

40 En algunas realizaciones, el F^1 es un fluoróforo y F^2 es un extintor y en otras realizaciones F^2 es un fluoróforo y F^1 es un extintor. En realizaciones preferidas, el MGB está unido al extremo 3' del oligonucleótido.

En una realización la presente realización comprende ligandos de unión al surco menor cortos de fórmula:



5 en la que MGB M es un ligando de unión al surco menor; $\text{F}^1 = \text{F}^2$ es un fluoróforo o un extintor a condición de que siempre F^1 y F^2 no puedan ser ambos extintores o ambos fluoróforos; y $[\text{A-B}]_n$ representa un oligómero de ácido nucleico con n unidades, en donde n es un número entero de 9 a 11. Cada A independientemente representa un componente de cadena principal de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en una cadena principal de fosfato de azúcar, una cadena principal de fosfato de azúcar modificada, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, una cadena principal peptídica o una variante de la misma utilizada en la preparación de ácido nucleico; y cada B independientemente representa una base de ácido nucleico, una base modificada, o un análogo de base o una base universal o promiscua (indiscriminada) y la parte de oligonucleótido tiene una secuencia complementaria a una parte de la secuencia diana que está siendo amplificada en la PCR digital, y proporciona una mezcla.

10 En algunas realizaciones las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor, hibrida con una diana amplificada digitalmente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor pueden ser utilizadas en la determinación del número de copias de la línea germinal.

15 En algunas realizaciones, las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor pueden ser utilizadas en la detección de una mutación rara en un gran exceso de un fondo de tipo silvestre.

En algunas realizaciones el extintor tiene un espectro de absorción de entre aproximadamente 400 a 800 nm y el fluoróforo tiene una emisión de entre aproximadamente 400 a 800 nm.

20 En otra realización, las sondas de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor comprenden al menos una B independientemente seleccionada de entre una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base o una base universal o promiscua. Son bases modificadas preferidas, Súper G, Súper A, Súper T y Súper inosina.

En algunas realizaciones, el F^1 es un fluoróforo y F^2 es un extintor y en otras realizaciones F^2 es un fluoróforo y F^1 es un extintor. En realizaciones preferidas, el MGB está unido al extremo 3' del oligonucleótido.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos, se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la presente invención reivindicada.

Amplificación por PCR

30 Se realizó la PCR básicamente según se describe en el documento US 7,384,818 con las siguientes modificaciones, se utilizaron 35-45 ciclos de PCR de tres etapas (95°C durante 30 s 56°C durante 30 s y 76°C durante 30 s) después de dos minutos a 50°C y dos minutos a 95°C. Las reacciones contenían 0,25 μM MB-FI-ODN-Q o sonda no-MB, 100 nM de cebador complementarios a la misma cadena que la sonda, 1 μM opuesta al cebador de la cadena, 125 μM dATP, 125 μM dCTP, 125 μM TTP, 250 μM dUTP, 0,25 U JumpStart ADN polimerasa (Sigma), 0,125U de AmpErasa Uracil-N-glicosilasa (Applied Biosystems) en un tampón 1X PCR (20 nM Tris-HCl pH 8,7, 40 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) en una reacción de 10 μl . El aumento en la señal fluorescente se registró durante la etapa de hibridación de la reacción.

35 Amplificación por PCR Digital en gotas

Se realizó amplificación por ddPCR según se describe en Pinheiro et al., Anal Chem. 2012 Enero 17; 84(2): 1003-1011.

Ejemplo 1

40 Este ejemplo demuestra la realización de la hibridación a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C, o ~22°C) de un oligonucleótido MGB de 10-mer en comparación con un oligonucleótido no-MGB, demostrando a) el fondo mejorado y b) la mejora de la capacidad del oligonucleótido MGB para discriminar los alelos A y C. Las secuencias de las sondas específicas para dos dianas sintéticas cortas se muestran en la Tabla 1. Las concentraciones de la sonda utilizadas fueron 600 nM y se realizaron concentraciones diana 600 nM e hibridaciones en el tampón PCR.

Tabla 1. Sonda y secuencias diana sintéticas para alelos A- y C- con Tms. T* es Súper T, Q es la Eclipse de extintor oscuro (no fluorescente) y FAM y AP 525 (US 7,671,218) son colorantes fluorescentes. Los alelos se muestran en negrita.

Seq ID Nº	Tipo	Secuencia (Oligo)	Tm °C
1	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTTCTGC	50,1
2	MGB-FAM-Oligo-Q	TTATT*TATGC	49,5
3	AP525-Oligo-Q	TTATTT CTGC	20,57
4	FAM-Oligo-Q	TTATT*TATGC	23,0
5	Diana sintética del alelo G	CTGCAAATAGCAGAAATAAAAGAAA	
6	Diana sintética del alelo T	CTGCAAATAGCATAAATAAAAGAAA	

5 Las curvas de fluorescencia de fusión en bruto se muestran en la Figura 1 para los canales FAM y Vic para ambas sondas MGB de 10-mer (Seq. ID. Nos 1 y 2) y las sondas No-MGB de 10-mer (Seq. ID. Nos 3 y 4) cuando se encuentran hibridadas a dianas sintéticas (Seq. ID. Nos. 5 y 6). Las curvas de fluorescencia de fusión en bruto mostraron una fluorescencia del fondo sustancialmente más elevada para las sondas no-MGB que para las sondas MGB. Este dato se confirmó cuando se generó un diagrama de dispersión con muestras replicadas que contenían o bien el alelo "A", el alelo "C" o controles sin plantilla (NTC, por sus siglas en inglés) utilizando tanto las sondas MGB como las sondas no-MGB en la Figura 2. El elevado fondo con las sondas no-MGB se refleja por la observación de que los valores de los NTC y del alelo "C" se encuentran agrupados de forma cercana entre sí; en contraste, los bajos valores de fondo de las sondas MGB para los valores del alelo "C" están situados a una distancia sustancial de los valores de los NTC.

15 Ejemplo 2

Este ejemplo compara la realización de la hibridación a temperatura ambiente (~22°C) de sondas de 16/17-mer, 11-mer y 10-mer MGB MGB-FI-oligo-Q, demostrando la capacidad mejorada del oligonucleótido MGB más corto para discriminar los alelos A y C. Las secuencias de las sondas específicas para dos dianas sintéticas cortas se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones utilizadas para sondas de 10-mer y 11-mer fue 600nM y para los 16/17-mers fueron 200nM para compensar la extinción que tiene lugar en sondas MGB-FI-oligo-Q más cortas. Se conoce que la señal y el fondo de la sonda MGB-FI-oligo-Q de 10-mer es aproximadamente la mitad de la sonda de 16-mer (Lukhtanov et al, Nucl. Acids Res., 35:e30 (2007)) debido a la menor distancia entre el fluoróforo y el extintor. Las concentraciones diana fueron equivalentes a las concentraciones de la sonda y las hibridaciones realizadas en el tampón de PCR.

25 Tabla 2. Sonda MGB-FI-oligo-Q y secuencias diana sintéticas para alelos A- y C- con Tms y ΔTms. T* es Súper T, Q es la Eclipse de extintor oscuro (no fluorescente) y FAM y AP 525 (US 7,671,218) son colorantes fluorescentes.

Seq ID Nº	Tipo	Secuencia (Oligo)	Tm °C	Δ Tm °C
1	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTT CTGC (10-mer)	50,6	18,0
2	MGB-FAM-Oligo-Q	TTATT*TATGC (10-mer)	49,5	9,5
7	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTT CTGCT (11-mer)	54,4	18,2
8	MGB-FAM-Oligo-Q	TTATT*TATGCT* (11-mer)	54,3	8,1
9	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTT CTGCTATTTG (16-mer)	64,1	14,1
10	MGB-FAM-Oligo-Q	CTGCAAATAGCATAAATAAAAGAAA		
5	Diana sintética del alelo G	CTGCAAATAGCAGAAATAAAAGAAA		
6	Diana sintética del alelo T	CTGCAAATAGCATAAATAAAAGAAA		

Tal como se muestra en la Tabla 2, la capacidad para discriminar el desapareamiento A:G según se mide por ΔTm aumenta de 4,2 °C para el 17-mer (Seq.ID No 10) a 9,5 °C para el 10-mer (Seq. ID No 2). Mientras que el ΔTm aumenta de 14,1°C para el 10-mer (Seq.ID No 9) a 17,3 °C para el 10-mer (Seq. ID No 1) para el desapareamiento

C:T. Este dato se confirmó cuando se generó un diagrama de dispersión con muestras replicadas que contenían el alelo "A", el alelo "C" o controles sin plantilla (NTC) utilizando las diferentes sondas MGB (Tabla 2) en la Figura 3.

Sorprendentemente, las sondas MGB-FI-oligo-Q más cortas (10-mer o 11-mer) muestran una discriminación sustancialmente mejor que las sondas de 16/17-mer, tal como se refleja en los valores de espaciado de los alelos "C" y "A" en el diagrama de dispersión.

Ejemplo 3

Este ejemplo compara la capacidad de las sondas TaqMan® de 30-mer, Pleiades de 16/17-mer y Pleiades de 10-mer para discriminar el alelo rs 121912462 en el gen APC a temperatura ambiente de una diana genómica amplificada digitalmente. La diana fue amplificada y detectada tal como se ha descrito (Pinheiro et al., Anal Chem. 2012 Enero 17; 84(2): 1003-1011) con las concentraciones de cebador directo e inverso en 1000nM y 250nM respectivamente, y la concentración de la sonda a 600nM. Las secuencias de las sondas específicas para el alelo rs 121912462 diana se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores y sondas MGB-FI-oligo-Q específicas para rs 121912462 en el gen APC con correspondientes Tms.

Seq ID Nº	Tipo	Secuencia (Oligo)	Tm °C
1	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTTCTGC (10-mer)	50,6
2	MGB-FAM-Oligo-Q	TTATT*TATGC (10-mer)	49,5
9	MGB-AP525-Oligo-Q	TTATTTCTGCTATTTG (16-mer)	64,1
10	MGB-FAM-Oligo-Q	TTTATT*TATGCTATT*T*G (17-mer)	64,0
11	Hex-Oligo-Q	ACCCTGCAAATAGCAGAAATAAAAGAAAAG	
12	FAM-Oligo-Q	ACCCTGCAAATAGCATAAATAAAAGAAAAG	
13	Cebador directo	GACACAGGAAGCAGATTCTGCTAATACC	
14	Cebador inverso	CACAGGATCTTCAGCTGACCTAGTTC	

Los diagramas de dispersión de la detección fluorescente con las sondas de con doble marca TaqMan de 30-mer (Seq ID No.11 y 12), sondas Pleiades de 16/17-mer (Seq ID No. 9 y 10) y sonda Pleiades de 10-mer (Seq ID No. 1 y 2) del alelo amplificado por ddPCR rs 121912462 en el gen APC a temperatura ambiente se muestra respectivamente en la Figura 4a), 4b) y 4c) para la muestra de ADN genómica humana. Tal como se muestra en las Figuras 4a) y 4b) muestras heterocigóticas (que se muestran en el círculo) se encuentran agrupadas de forma cercana con los alelos "A" y "C". En contraste, las muestras heterocigóticas y especialmente el alelo "C" en la Figura 4c), se encuentran bien separadas, lo que permite una detección más precisa de alelos de baja abundancia.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra una actuación similar de las sondas MGB-FI-oligo-Q de 10-mer para discriminar los alelos del rs121913529 SNP en el gen KRAS a temperatura ambiente de un ADN genómico humano amplificado digitalmente. La diana fue amplificada y detectada tal como se describe en el Ejemplo 3. El diagrama de dispersión con las sondas MGB-FI-oligo-Q de 10-mer detalladas en la Tabla 4 (Seq ID Nos 13 y 14) se muestra en la Figura 5.

Tabla 4. Cebadores y sondas Pleiades MGB específicas para rs121913529 en el gen KRAS con correspondientes Tms.

Seq ID Nº	Tipo	Secuencia (Oligo)	Tm °C
15	MGB-AP525-Oligo-Q	G*AGCTGGTGG	47
16	MGB-FAM-Oligo-Q	G*AGCTGATGG	49

Tabla 4 (continuación)

Seq ID Nº	Tipo	Secuencia (Oligo)	Tm °C
17	Cebador directo	CCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGT	
18	Cebador inverso	GCTGTATCGTCAAGGCACTC	

5 Tal como se muestra en la Figura 5, las sondas Pleiades de 10-mer discriminan bien entre alelos "C" y "T" del alelo amplificado rs 121913529 en el gen KRAS con un espaciado definido entre los alelos "G" y "A" heterocigóticos del gen KRAS amplificado.

Referencias citadas

Documentos de patentes de EE.UU.

Patente de EE.UU. Nº 6,440,706

Patente de EE.UU. Nº 6,440,706

10 Patente de EE.UU. Nº 7,381,818

Patente de EE.UU. Nº 7,759,126

Bibliografía de documentos que no son patentes

Chang y Shih, *Methods Mol Med.* 103:137-41 (2005)

Hindson et al, *Anal. Chem.*, 83: 8604-8610 (2011)

15 Pinheiro et al., *Anal Chem.* 2012 Enero 17; 84(2): 1003-1011

Strain et al., *PLoS One.* 2013;8(4):e55943

Tsui et al, *Clin Chem.* 56(1):73-81 (2010)

Vogelstein y Kinzler, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9236-9241 (1999)

REIVINDICACIONES

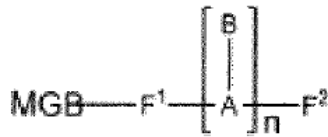
1. Método para discriminar un desapareamiento en una muestra de ADN, que comprende:

poner en contacto la muestra de ADN con una sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor; y

detectar una señal fluorescente de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor;

5 en donde la parte de oligonucleótidos de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor tiene una secuencia complementaria a una región de la muestra de ADN diana, y en donde la muestra de ADN diana es ADN amplificado digitalmente que es el resultado de una reacción ddPCR;

en donde la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor tiene la fórmula:



10 en donde MGB M es un ligando de unión al surco menor;

en donde $\text{F}^1 = \text{F}^2$ es un fluoróforo o un extintor, y en donde F^1 y F^2 no pueden ser ambos extintores o ambos ser fluoróforos;

en donde $[\text{A-B}]_n$ representa un oligómero de ácido nucleico que tiene n unidades, en donde n es un número entero de 9 a 11 ;

15 en donde cada A representa independientemente una cadena principal de fosfato de azúcar, una cadena principal de fosfato de azúcar modificada, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, o una cadena principal peptídica o una variante del mismo; y

en donde cada B representa independientemente una base de ácido nucleico, una base modificada, un análogo de una base, o una universal o promiscua.

20 2. Método según la reivindicación 1, en donde la detección se realiza a aproximadamente 20 °C a 25 °C.

3. Método según la reivindicación 1, en donde el extintor tiene un espectro de absorción entre aproximadamente 400 a 800 nm y el fluoróforo tiene una emisión entre aproximadamente 400 a 800 nm.

25 4. Método según la reivindicación 1, en donde la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor comprende al menos una B seleccionado independientemente de entre una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de una base, o una base universal o promiscua.

5. Método según la reivindicación 4, en donde la base modificada es Súper G, Súper A, Súper T, o Súper Inosina.

6. Método según la reivindicación 1, en donde F^1 es un fluoróforo y F^2 es un extintor.

7. Método según la reivindicación 1, en donde F^2 es un fluoróforo y F^1 es un extintor.

8. Método según la reivindicación 1, en donde el MGB está unido al F^1 en el extremo 3' del oligonucleótido.

30 9. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor que tiene la fórmula:



en donde MGB M es un ligando de unión al surco menor;

en donde $F^1 = F^2$ es un fluoróforo o un extintor, y en donde F^1 y F^2 no pueden ambos ser extintores o ambos ser fluoróforos;

5 en donde $[A-B]_n$ representa un oligómero de ácido nucleico que tienen n unidades, en donde n es un número entero de 9 a 11;

en donde cada A representa independientemente una cadena principal de fosfato de azúcar, una cadena principal de fosfato de azúcar modificada, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, o una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, o una cadena principal peptídica o una variante de la misma;

10 en donde cada B representa independientemente una base de ácido nucleico, una base modificada, un análogo de una base, o una base universal o promiscua,

en donde la parte de oligonucleótidos de la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor tiene una secuencia complementaria a una muestra de ADN diana, y la muestra de ADN diana es ADN amplificado digitalmente que es el resultado de una reacción ddPCR.

15 10. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 9, en donde el extintor tiene un espectro de absorción entre aproximadamente 400 a 800 nm y el fluoróforo tiene una emisión entre aproximadamente 400 a 800 nm.

11. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 9, en donde la sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor comprende al menos una B independientemente seleccionada de una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de una base, o una base universal o promiscua.

20 12. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 11, en donde la base modificada es Súper G, Súper A, Súper T, o Súper Inosina.

13. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 9, en donde F^1 es un fluoróforo y F^2 es un extintor.

25 14. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 9, en donde F^2 es un fluoróforo y F^1 es un extintor.

15. Sonda de oligonucleótidos con ligando de unión al surco menor según la reivindicación 9, en donde el MGB está unido al F^1 en el extremo 3' del oligonucleótido.

FIGURA 1

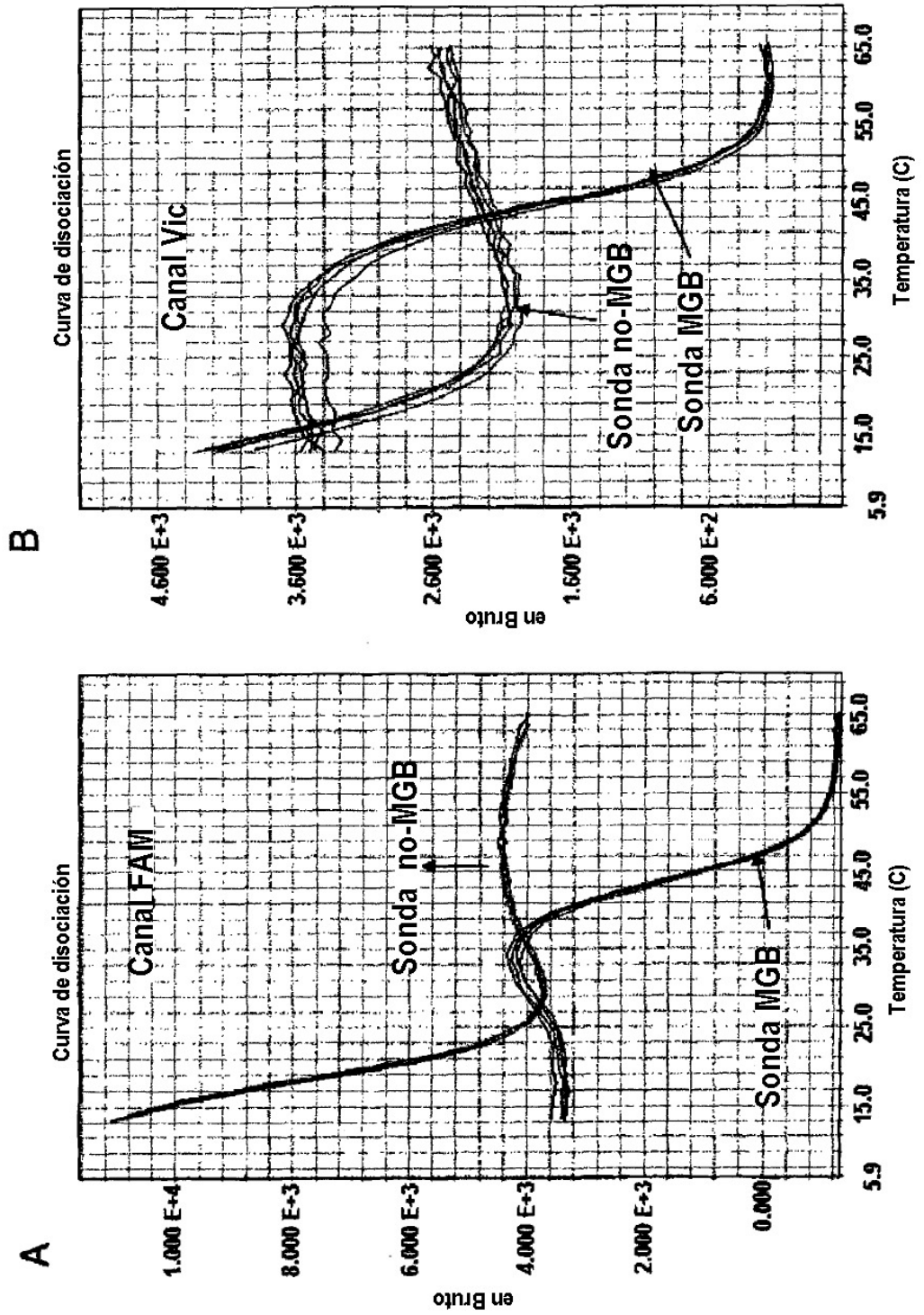


FIGURA 2

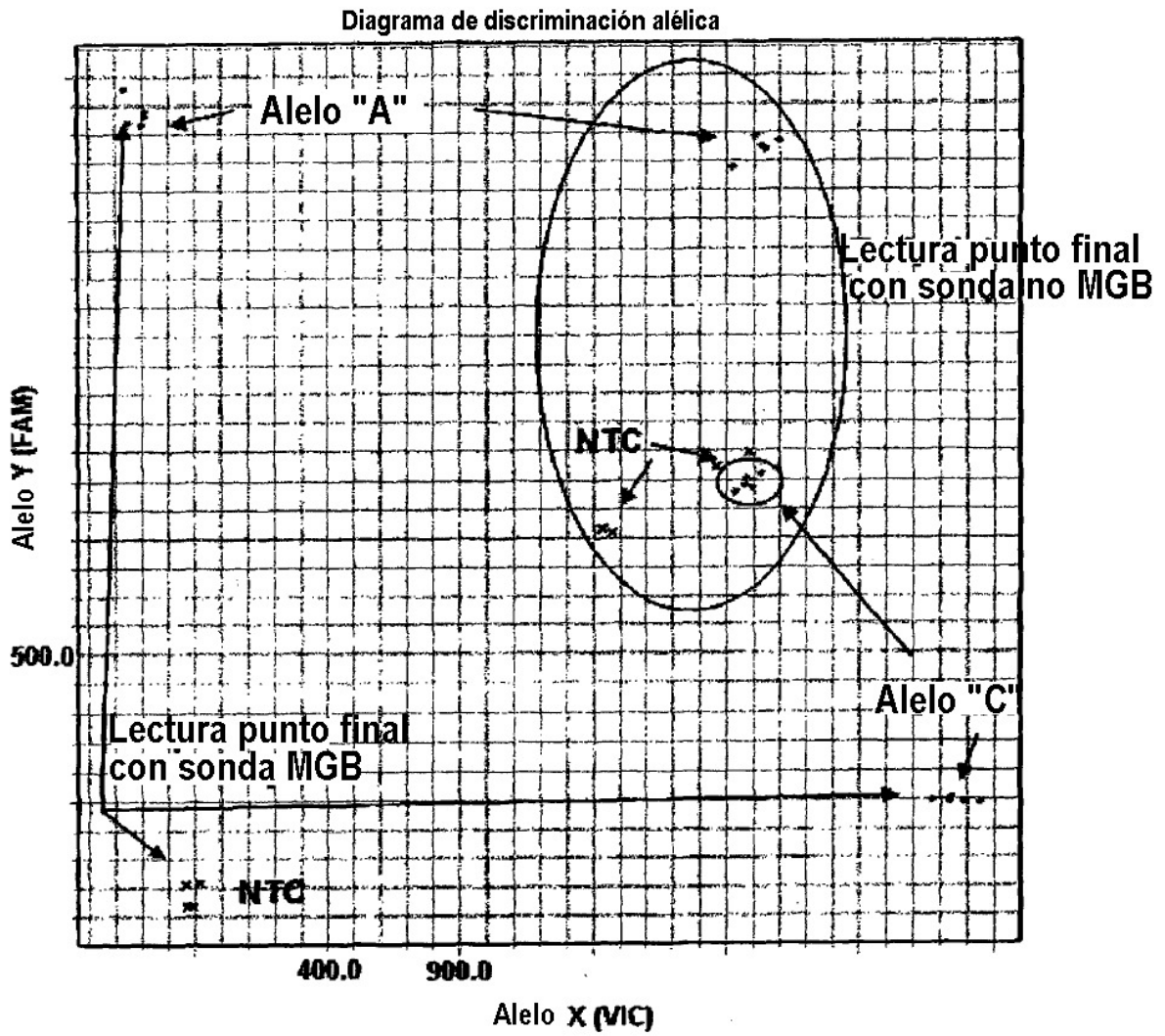


FIGURA 3

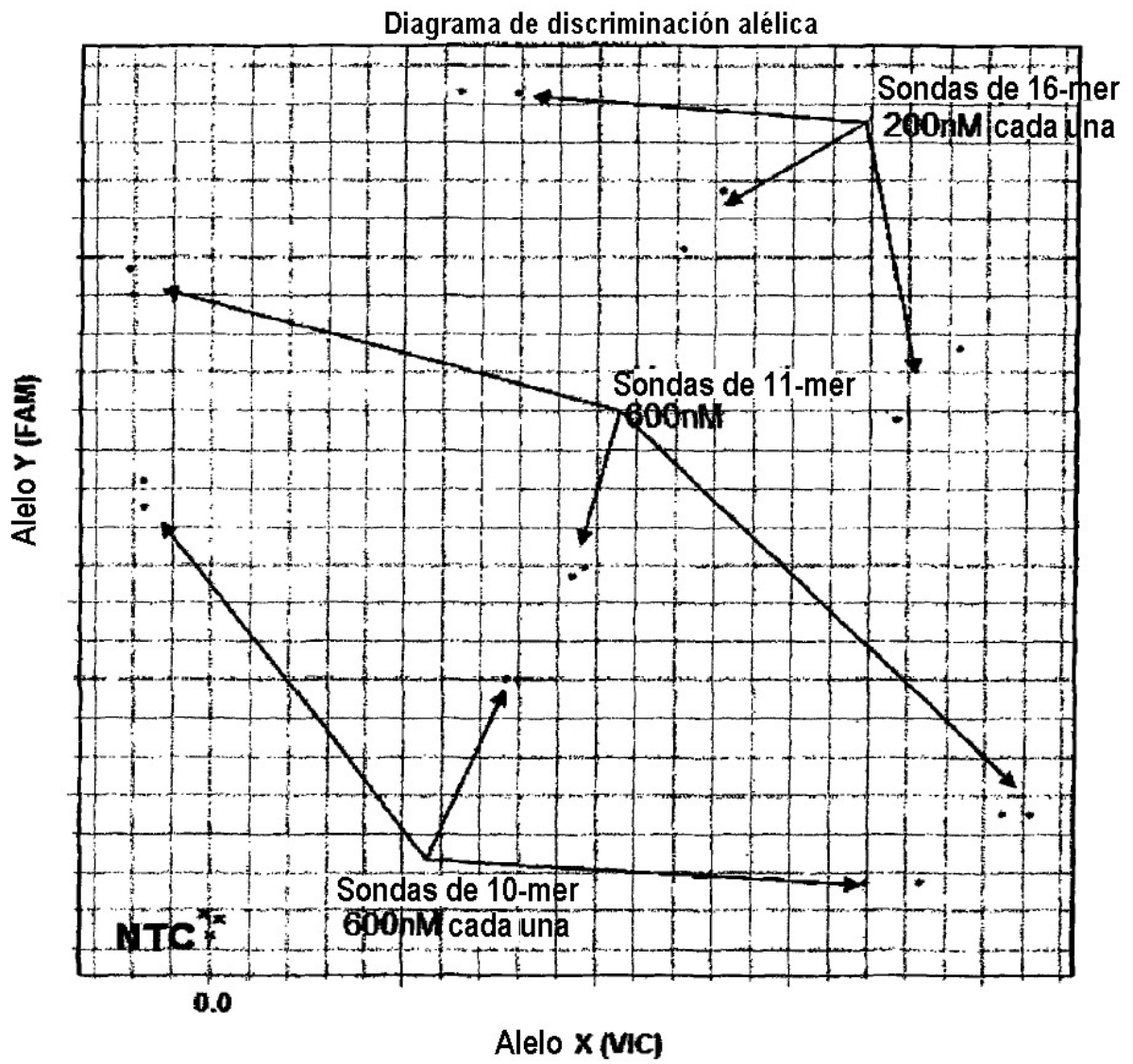


FIGURA 4

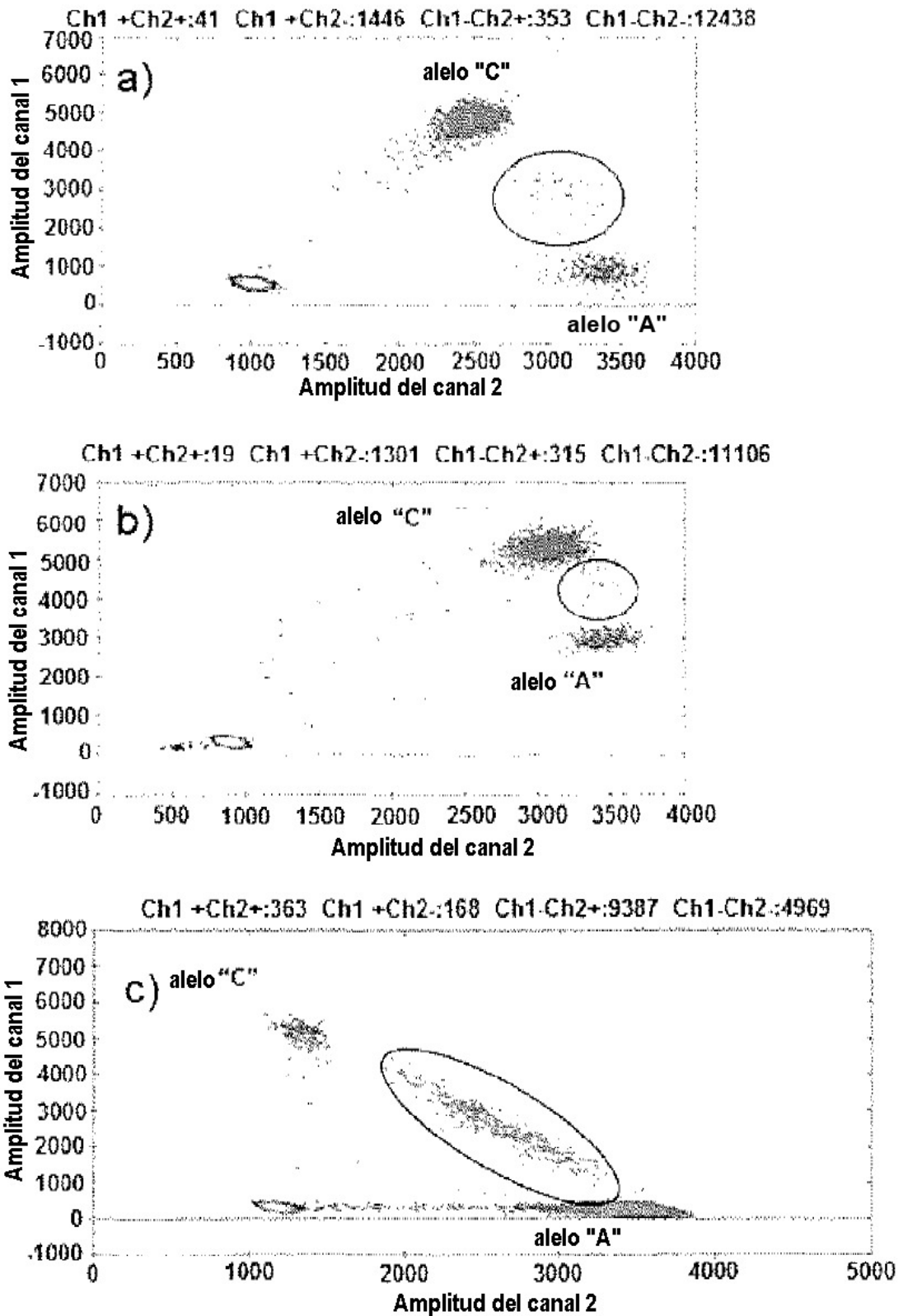


FIGURA 5

