

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 803**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/EP2014/077309**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14830952 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 3080297**

54 Título: **Detección de polimorfismo mononucleotídico usando sondas de hidrólisis con estructura de horquilla en 3'**

30 Prioridad:

13.12.2013 US 201314106456

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

MEHTA, ROCHAK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 663 803 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 polimorfismo mononucleotídico usando sondas de hidrólisis con estructura de horquilla en 3'

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y más particularmente, a procedimientos de detección de PCR que utilizan sondas de hidrólisis.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La PCR es una forma eficaz y rentable de copiar o "amplificar" segmentos pequeños de ADN o ARN. Usando la PCR, se generan millones de copias de una sección de ADN en solo unas pocas horas, produciendo suficiente ADN requerido para el análisis. Este procedimiento permite a los médicos diagnosticar y hacer seguimiento de enfermedades usando una cantidad mínima de muestra, tal como sangre o tejido. La PCR en tiempo real permite que se produzca la amplificación y la detección al mismo tiempo. Un procedimiento de detección se hace utilizando sondas de hidrólisis de oligonucleótidos (también conocidas como sondas TaqMan®) que tienen un fluoróforo unido covalentemente, por ejemplo, al extremo 5' de la sonda oligonucleotídica y un extintor unido, por ejemplo, internamente o en el extremo 3'. Las sondas de hidrólisis son sondas de oligonucleótidos doblemente marcadas que se basan en la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de la polimerasa Taq para escindir la sonda de hidrólisis durante la hibridación con la secuencia diana complementaria, y dan como resultado una detección basada en fluorescencia.

Los procedimientos de PCR en tiempo real se pueden usar para amplificar y detectar variaciones de secuencia en ácidos nucleicos diana que tienen polimorfismo mononucleotídico (SNP). Sin embargo, muchos de los ensayos de detección/genotipado de SNP disponibles se basan en la suposición de que el SNP es bialélico (véase, por ejemplo, Morita *et al.*, Mol. Cel. Probes, 2007, 21, 171-176). La detección de SNP con procedimientos de PCR en tiempo real existentes actualmente carece de suficiente sensibilidad y especificidad. Las sondas de hidrólisis, tales como las sondas TaqMan® estándar, se diseñan típicamente para tener una longitud de aproximadamente 18 a 22 bases para que tengan una temperatura de fusión (Tm) de 8-10 °C más alta en comparación con el cebador. Las sondas estándar TaqMan® en general resultan ser menos específicas y sensibles para la detección de SNP y no muestran una discriminación completa entre las dianas WT (naturales) y MT (mutantes). Los ensayos de genotipado de SNP basados en TaqMan® actuales implican el uso de sondas MGB (ligandos del surco menor) TaqMan® que tienen una longitud más corta con una estabilidad de fijación de sonda-molde aumentada para la discriminación alélica. Las modificaciones de bases adicionales tales como las bases estabilizantes (propinil dU, propinil dC) también se pueden incluir en el diseño de la sonda TaqMan® estándar para una detección y discriminación de SNP mejoradas. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento rápido y fiable para detectar específicamente los SNP de una manera sensible.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

La materia objeto de la presente divulgación incluye sondas de hidrólisis específicas de SNP que se diseñan para incluir una estructura de horquilla hacia el extremo 3'. Dichas sondas de hidrólisis no implican necesariamente el uso de modificaciones de bases adicionales tales como propinil dU, propinil dC o moléculas especiales tales como las MGB. La estructura de horquilla cerca del extremo 3' de la sonda retrasa la hibridación de la porción 3' de la sonda con el molde y, por lo tanto, ayuda a discriminar las dianas WT y MT basándose en el único emparejamiento incorrecto entre el indicador y el extintor que está cerca del extremo 5'. La porción 5' de la sonda específica de SNP se puede hibridar más eficazmente con el molde MT en comparación con el molde WT. Cuando la sonda específica de SNP encuentra la diana WT, el único emparejamiento incorrecto a la diana WT puede prevenir la hibridación y la escisión de la sonda y, por lo tanto, no se puede detectar la fluorescencia.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra, incluyendo el procedimiento realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un cebador que comprende una primera secuencia de ácido nucleico para producir un producto de amplificación si está presente en la muestra algún ácido nucleico diana; realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de hidrólisis específica de SNP que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene SNP del producto de amplificación, comprendiendo la sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, un extremo 5' y un extremo 3', y una estructura de horquilla hacia el extremo 3', comprendiendo la estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales (por ejemplo, cambiados o adicionales) para producir la estructura de horquilla; y detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en el que la presencia de los productos de amplificación es indicativa de la presencia del SNP en la diana de ácido nucleico diana, y en el que la ausencia de los productos de amplificación es indicativa de la ausencia del SNP en la diana de ácido nucleico diana. En un modo de realización, el primer marcador interactivo comprende un resto fluorescente donador en el extremo 5', y el segundo marcador interactivo comprende un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis. En determinados modos de realización, el resto fluorescente aceptador es un extintor. En otro modo de realización, la amplificación emplea una enzima

polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'. En otro modo de realización, la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprenden al menos un nucleótido modificado. En otro modo de realización más, la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis tienen 40 o menos nucleótidos.

En otro aspecto, se proporciona un kit para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra, que incluye al menos un cebador que incluye una primera secuencia de ácido nucleico específica para producir un producto de amplificación del ácido nucleico diana; y una sonda de hidrólisis específica de SNP que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene SNP del producto de amplificación, comprendiendo la sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, un extremo 5' y un extremo 3', y una estructura de horquilla hacia el extremo 3', comprendiendo la estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales (por ejemplo, cambiados o adicionales) para producir la estructura de horquilla. En un modo de realización, el primer marcador interactivo comprende un resto fluorescente donador en el extremo 5', y el segundo marcador interactivo comprende un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis. En determinados modos de realización, el resto fluorescente aceptador es un extintor. En otro modo de realización, el kit comprende además una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'. En otro modo de realización, la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprenden al menos un nucleótido modificado. En otro modo de realización más, la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis tienen 40 o menos nucleótidos.

En un aspecto, se proporciona una sonda de hidrólisis específica de SNP que incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene SNP del producto de amplificación, comprendiendo la sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, un extremo 5' y un extremo 3', y una estructura de horquilla hacia el extremo 3', comprendiendo la estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales (por ejemplo, cambiados o adicionales) para producir la estructura de horquilla. En un modo de realización, el primer marcador interactivo puede ser un resto fluorescente donador hacia, cerca o en el extremo 5', y el segundo marcador interactivo puede ser un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis. En determinados modos de realización, el resto fluorescente aceptador es un extintor. En otro modo de realización, la secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprende al menos un nucleótido modificado. En otro modo de realización más, la sonda de hidrólisis tiene 40 o menos nucleótidos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra curvas de amplificación por PCR en tiempo real para la detección del SNP 526N usando una sonda de hidrólisis con una estructura de horquilla hacia el extremo 3'.

La FIGURA 2 muestra la localización del SNP 526N (CAC/AAC) en una porción de un plásmido MT (SEQ ID NO: 5) y plásmido WT (SEQ ID NO: 6) y una sonda sin horquilla (flecha larga) con una base terminal reemplazada para prevenir interacciones intermoleculares.

La FIGURA 3 muestra la secuencia (SEQ ID NO: 1) de una sonda de hidrólisis para la localización del SNP 526N diseñada con una estructura de horquilla en el extremo 3' que tiene tres bases reemplazadas para formar la horquilla.

La FIGURA 4 muestra curvas de amplificación por PCR en tiempo real para la detección del SNP 526N usando una sonda de hidrólisis sin una estructura de horquilla.

La FIGURA 5 muestra curvas de amplificación por PCR en tiempo real para la detección del SNP 531L usando una sonda de hidrólisis con una estructura de horquilla hacia el extremo 3'.

La FIGURA 6 muestra la localización del SNP 531L (TCG/TTG) en una porción de un plásmido MT (SEQ ID NO: 7) y el plásmido WT (SEQ ID NO: 8) y una sonda sin horquilla (flecha larga).

La FIGURA 7 muestra la secuencia (SEQ ID NO: 3) de una sonda de hidrólisis para la localización del SNP 531L diseñada con una estructura de horquilla en el extremo 3' que tiene una base reemplazada para formar la horquilla.

5 La FIGURA 8 muestra curvas de amplificación por PCR en tiempo real para la detección del SNP 531L usando una sonda de hidrólisis sin una estructura de horquilla.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 En el presente documento se describen procedimientos, kits y sondas de hidrólisis para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra. La sensibilidad aumentada de PCR en tiempo real para la detección de un SNP en un ácido nucleico diana en comparación con otros procedimientos, así como las características mejoradas de PCR en tiempo real que incluyen la contención de la muestra y la detección en tiempo real del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico de rutina y la detección de un SNP en un ácido nucleico diana en el laboratorio clínico.

15 Los procedimientos pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una o más porciones de una molécula de ácido nucleico diana, por ejemplo, una diana génica que contiene el SNP de interés que se va a detectar, en una muestra usando uno o más cebadores o uno o más pares de cebadores. Como se usa en el presente documento, "cebador", "cebadores" y "pares de cebadores" se refieren a cebador(es) oligonucleotídico(s) que se hibridan específicamente con la diana de secuencia de ácido nucleico, e inician la síntesis a partir de los mismos en condiciones apropiadas. Cada uno de los cebadores se hibrida con una región dentro o adyacente a la molécula de ácido nucleico diana respectiva de manera que al menos una porción de cada producto de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la diana respectiva y al SNP, si está presente. Se produce un producto de amplificación siempre que el ácido nucleico diana esté presente en la muestra, independientemente de si el SNP de interés está presente o no en la molécula de ácido nucleico diana.

20 El procedimiento también puede incluir una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de hidrólisis específica de SNP que incluye una secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene el SNP del producto de amplificación. La sonda de hidrólisis específica de SNP puede incluir un primer y un segundo marcador interactivo, un extremo 5' y un extremo 3', y una estructura de horquilla hacia el extremo 3'. La estructura de horquilla se puede diseñar para incluir una región de ácido nucleico que no es natural que puede incluir uno o más nucleótidos cambiados que no son parte de la secuencia natural, o puede incluir uno o más nucleótidos no naturales adicionales, que son nucleótidos añadidos a la secuencia natural, para producir la estructura de horquilla. De esta manera, una secuencia de ácido nucleico que normalmente no forma una estructura de horquilla en el extremo 3' se puede diseñar para formar una horquilla, por ejemplo, alterando la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, cambiando uno o más nucleótidos en la secuencia hacia el extremo 3', o añadiendo uno o más nucleótidos a la secuencia de ácido nucleico en el extremo 3'.

30 Para detectar si el SNP de interés está o no presente o está ausente en la diana de ácido nucleico en la muestra, el producto de amplificación se detecta por medio del marcador detectable que se libera de la sonda de hidrólisis específica de SNP. Si el producto de amplificación se detecta por medio de la sonda de hidrólisis específica de SNP, indica la presencia de SNP. Si de forma alternativa, el producto de amplificación no se detecta por medio de la sonda de hidrólisis específica de SNP, no indica la presencia de SNP. Por lo tanto, la presencia de los productos de amplificación es indicativa de la presencia del SNP en la diana de ácido nucleico diana, y la ausencia de los productos de amplificación es indicativa de la ausencia del SNP en la diana de ácido nucleico diana.

35 Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas hebras de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico diana para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) o virus de la hepatitis C (VHC)). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente desnaturalizar el ácido nucleico molde, hibridar cebadores con el ácido nucleico molde a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación requiere típicamente la presencia de trifosfatos de desoxirribonucleósidos, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Taq Platinum®) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl). El término "cebador" se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir "nucleótidos" adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5' por la que se usan trifosfatos de desoxinucleósidos y por la que se libera pirofosfato. En general, los cebadores se diseñan basándose en secuencias molde conocidas. Un cebador ceba la hebra codificante, y el otro ceba la hebra complementaria del ADN o ADNc diana. La PCR se puede realizar en un ADN o ARN diana uniforme (es decir, dianas con la misma secuencia) o en ADN o ARN dianas variados (es decir, dianas con diferentes secuencias intermedias flanqueadas por secuencias conservadas). Para ADN/ARN variados (por ejemplo, que contienen heterogeneidad de secuencia) incluso cebadores emparejados incorrectamente pueden funcionar en la reacción de PCR si las secuencias de las dianas tienen suficiente

complementariedad con los cebadores emparejados incorrectamente (es decir, cebadores tolerantes).

El término "hibridación" se refiere a la hibridación de una o más sondas con un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación incluyen típicamente una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación inespecífica de las sondas.

La expresión "actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada a la síntesis de la hebra de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es termoestable, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra del molde. Las polimerasas termoestables se han aislado a partir de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

La expresión "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que tiene la misma longitud y es exactamente complementario a un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento", cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que añade típicamente nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima, por ejemplo, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o mediante inspección visual. Los algoritmos ejemplares que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990), "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish *et al.* (1993), "Identification of protein coding regions by database similarity search", *Nature Genet.* 3:266-272, Madden *et al.* (1996), "Applications of network BLAST server", *Meth. Enzymol.* 266:131-141, Altschul *et al.* (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y Zhang *et al.* (1997), "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation", *Genome Res.* 7:649-656.

Un "nucleótido modificado", en el contexto de un oligonucleótido, se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia de oligonucleótidos se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, una C5-metil-dU, una C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, una C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, una C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantósina, un análogo de pirazolopirimidina, un pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-O-metil ribo-U, 2'-O-metil ribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA, y similares. Muchos otros nucleótidos modificados que se pueden sustituir en los oligonucleótidos de la invención se mencionan en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (Tm) de los oligonucleótidos con relación a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar adicionalmente, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácido nucleico inespecífica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebadores o similares), aumentar el rendimiento de un amplicón diana deseado, y/o similares en algunos modos de realización de la invención. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleótido no natural", en el contexto de la estructura de horquilla hacia el extremo 3' de la sonda como se describe en el presente documento, se refiere a un nucleótido que no es un nucleótido natural en la secuencia natural, por ejemplo, en la secuencia natural. Dicho nucleótido no natural es un nucleótido que se ha cambiado, por ejemplo, de A a G, o puede ser un nucleótido no natural añadido, por ejemplo, se puede insertar una G en la secuencia. La inclusión del/de los nucleótido(s) no natural(es) se diseña en la secuencia natural para producir la estructura de horquilla, en otras palabras, la secuencia natural se puede genomanipular para forzar una estructura de horquilla en la que no se produciría de forma natural una estructura de horquilla. La secuencia natural se diseña para incluir una estructura de horquilla hacia el extremo 3' cambiando o añadiendo al menos un nucleótido no natural en la secuencia natural, por ejemplo, se pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos no naturales en la secuencia natural para producir la estructura de horquilla. En determinados modos de

realización, el/los nucleótido(s) no natural(es) puede(n) comprender un nucleótido modificado.

Ácidos nucleicos y oligonucleótidos diana

5 La presente descripción proporciona procedimientos para detectar SNP en un ácido nucleico diana amplificando, por ejemplo, una porción de las secuencias de ácido nucleico diana, que puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico
 10 diana en la que se sabe o se sospecha que comprende uno o más SNP, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana de, por ejemplo, VIH, VHC o MTB que es resistente a la rifampicina. Para la detección de SNP en la secuencia de ácido nucleico diana, se pueden preparar cebadores y sondas para amplificar las secuencias de ácido nucleico
 15 diana. También, se pueden evaluar variantes funcionales con respecto a la especificidad y/o la sensibilidad por los expertos en la técnica usando procedimientos de rutina. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones en los cebadores y/o las sondas divulgados en el presente documento. Por ejemplo, se puede proporcionar una variante sustancialmente idéntica de los cebadores o las sondas en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80 %, un 90 % o un 95 % de identidad de secuencia con uno de los cebadores y sondas originales, o con un complemento de los mismos.

20 Se puede identificar una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o las sondas que proporcione una especificidad y sensibilidad similares o más altas en los procedimientos, kits o sondas de hidrólisis descritos a continuación en comparación con las secuencias originales respectivas.

25 Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o una sonda pueden comprender un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Una sonda (o un cebador) es entonces un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero consisten todavía en una base o un compuesto de tipo base, un
 30 azúcar pentofuranosilo o un compuesto de tipo azúcar pentofuranosilo, una porción de fosfato o una porción de tipo fosfato, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la porción de base de un "nucleótido", por lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, por lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Las expresiones "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se usan indistintamente en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera señalada anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo de nucleótido").

35 Los oligonucleótidos que incluyen oligonucleótidos modificados y análogos de oligonucleótido que amplifican las secuencias de ácido nucleico diana se pueden diseñar usando, por ejemplo, un programa informático tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colorado). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, mediante electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores deben ser lo suficientemente largos para hibridar con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan
 40 largos que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen una longitud de 8 a 50, particularmente de 10 a 40 o de 12 a 40 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos).

45 Además de un conjunto de cebadores, los presentes procedimientos pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de SNP en una secuencia de ácido nucleico diana. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos producidos sintética o biológicamente (ADN o ARN) que, por diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridar bajo restricciones predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana". Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", lo que significa que detecta el ácido nucleico diana. En algunos modos de realización de la presente invención, las sondas
 50 descritas se pueden marcar con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, las sondas se pueden marcar con un resto fluorescente donador, por ejemplo, un colorante fluorescente y un resto fluorescente aceptador correspondiente, por ejemplo, un extintor.

55 El diseño de oligonucleótidos que se van a usar como sondas de hidrólisis TaqMan se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización de la presente invención pueden usar una única sonda para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, la sonda puede incluir al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Al igual que con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas de oligonucleótidos en general tienen 40 o menos nucleótidos y particularmente tienen una longitud de 12 a 40, 15 a 40 y 15 a 30 (por
 60 ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

65 Las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. Las patentes de EE. UU. n.ºs 5.210.015; 5.487.972; 5.804.375; 5.804.375; 6.214.979; y 7.141.377 divulgan técnicas

de PCR en tiempo real y de TaqMan®. La PCR emplea típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que se fijan a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en los modos de realización descritos incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico diana. Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción mediante procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es mediante calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de hebras se puede conseguir mediante cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento para separar las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza predominantemente (por ejemplo, se desnaturaliza más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal de tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se van a desnaturalizar, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min). Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza mediante calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador con su secuencia diana en las moléculas de ácido nucleico diana. La temperatura para la hibridación es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). La mezcla de reacción se ajusta entonces a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía en general de desde aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico diana tal como ARN o ADN (ADNc). El ácido nucleico molde no tiene que estar purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como el ácido nucleico diana contenido en las células humanas. Las moléculas de ácido nucleico diana se pueden extraer a partir de una muestra biológica mediante técnicas de rutina tales como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing *et al.* (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Los ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de muchísimas fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales que incluyen bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de cadena en general incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %. Las reacciones contienen normalmente de 150 a 320 µM cada una de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las sucesivas etapas de la reacción. Las etapas de separación, hibridación y alargamiento de la hebra se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, de enzima termoestable y de trifosfatos de nucleósidos presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para el uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana suficientemente para la detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente se posicionan a una determinada distancia uno del otro, tiene lugar transferencia de energía entre los

dos restos fluorescentes que se puede visualizar o detectar de otro modo y/o cuantificar. El donador transfiere típicamente la energía al aceptador cuando se excita el donador mediante radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptador reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente.

5 En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donador y un extintor correspondiente, que disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los dos restos fluorescentes, de manera que la emisión fluorescente desde el resto fluorescente donador se extingue. Durante una etapa de extensión de una reacción en
10 cadena de la polimerasa, se escinde una sonda fijada a un producto de amplificación mediante la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de manera que la emisión fluorescente del resto fluorescente donador ya no se extingue. Las sondas ejemplares para este propósito se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.ºs 5.210.015; 5.994.056; y 6.171.785. Los pares de donador-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros
15 usados comúnmente incluyen BlackHole Quencher™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

El análisis fluorescente se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para controlar la emisión fluorescente en el
20 intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía se puede llevar a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

25 Como se usa en el presente documento con respecto a los restos fluorescentes donadores y aceptadores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptador que tiene un espectro de emisión que se superpone al espectro de excitación del resto fluorescente donador. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donador. En consecuencia, se puede producir transferencia de energía
30 no radiativa eficaz entre ellos.

Los restos fluorescentes donadores y aceptadores correspondientes se eligen en general para (a) transferencia de energía de Forster de alta eficacia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) desplazamiento de la
35 emisión lo más lejos posible hacia la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente de agua Raman producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donador que tenga su máximo de excitación cerca de una línea de láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del resto fluorescente aceptador correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente aceptador
40 correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena superposición de su excitación con la emisión del resto fluorescente donador, y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donadores representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptadores en la tecnología FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, isotiocianato de 9-acridina, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-
45 4-metilcumarina, 1-pirenobutirato de succinimidilo y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptadores representativos, dependiendo del resto fluorescente donador usado, incluyen rojo LC 640, rojo LC 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonil lisamina rodamina B, isotiocianato de tetrametilrodamina, isotiocianato de rodamina x, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos
50 fluorescentes donadores y aceptadores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donadores y aceptadores se pueden unir al oligonucleótido sonda apropiado a través de una
55 sección conectora. La longitud de cada sección conectora es importante, ya que las secciones conectoras afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donadores y aceptadores. La longitud de una sección conectora para el propósito de la presente divulgación es la distancia en Angstroms (Å) desde la base de nucleótidos al resto fluorescente. En general, una sección conectora tiene de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. La sección conectora puede ser del tipo descrito en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga
60 procedimientos para unir secciones conectoras a una base de nucleótidos particular, y también para unir restos fluorescentes a una sección conectora.

Un resto fluorescente aceptador, tal como un éster de NHS de rojo LC 640, se puede combinar con C6-fosforamiditas (disponibles de ABI (Foster City, Calif.) o Glen Research (Sterling, Va.)) para producir, por ejemplo, rojo LC 640-
65 fosforamidita. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donador, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG

de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.), conectores de amida (derivado de éster de NHS de fluoresceína, tal como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)), o 3'-amino-CPG que requieren el acoplamiento de un éster de NHS de fluoresceína después de la síntesis de oligonucleótidos.

5 **Detección de un SNP en un ácido nucleico diana**

10 La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de un SNP en un ácido nucleico diana en un producto biológico. Los procedimientos proporcionados evitan problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos y falsos positivos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una porción de la molécula de ácido nucleico diana a partir de una muestra usando un par de cebadores, y una etapa de detección fluorescente que utiliza sondas de hidrólisis que tienen una estructura de horquilla hacia el extremo 3'. Se pueden realizar múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Los procedimientos descritos se pueden realizar usando los cebadores y las sondas para detectar la presencia del SNP en un ácido nucleico diana en la muestra.

15 Como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hidrólisis marcadas que aprovechan la tecnología FRET. Un formato de FRET utiliza la tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación y, por consiguiente, la presencia o ausencia de un SNP en un ácido nucleico diana. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hidrólisis de hibridación monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula extintora. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se fija al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 20 7700 (Applied Biosystems) usa la tecnología TaqMan® y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de un SNP en un ácido nucleico diana en la muestra. En general, la presencia de FRET indica la presencia del SNP en un ácido nucleico diana en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra. Sin embargo, la recogida inadecuada de muestras, retrasos en el transporte, condiciones de transporte inapropiadas o el uso de determinados hisopos de recogida (alginato de calcio o varilla de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o la exactitud del resultado de la prueba. Usando los procedimientos divulgados en el presente documento, la detección de FRET en, por ejemplo, 25 45 etapas de ciclado es indicativa de la presencia de un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra.

30 Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos para heridas, hemocultivos, piel e infecciones de tejidos blandos. Los procedimientos de recogida y almacenamiento de muestras biológicas se conocen por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, mediante procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico diana o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de reacción de PCR y los oligonucleótidos apropiados.

35 40 45 Dentro de cada serie del termociclador, también se pueden ciclar las muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico diana (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción de plásmido que contiene las moléculas de ácido nucleico diana. Dicho control de plásmido se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada, procesada en paralelo con las muestras de los pacientes. Cada serie del termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de ADN molde diana. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Por consiguiente, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de hibridar con especificidad de secuencia e iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridar con especificidad de secuencia y para que se produzca FRET.

45 50 55 En un modo de realización, los procedimientos de la invención incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.035.996; 5.683.896; y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una serie del termociclador y la siguiente.

60 65 Se pueden usar los procedimientos de PCR convencionales en conjunto con la tecnología FRET para llevar a la práctica los procedimientos de la invención. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real como se usa en la tecnología LightCycler®: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

El LightCycler® se puede hacer funcionar usando una estación de trabajo para PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede indicar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una indicación cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclo para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para un análisis posterior.

Se entiende que los modos de realización de la presente invención no están limitados por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

Artículos de fabricación/kits

La presente divulgación proporciona además artículos de fabricación o kits para detectar un SNP en un ácido nucleico diana. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas usados para detectar el SNP, junto con materiales de embalaje adecuados. Los cebadores y sondas representativos para la detección del SNP se pueden hibridar con las moléculas de ácido nucleico diana. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos de diseño de cebadores y sondas se divulgan en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican e hibridan con un SNP en una molécula de ácido nucleico diana de ácido nucleico diana.

Los artículos de fabricación de la invención también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, de forma alternativa, las sondas suministradas con el kit pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donador y/o un aceptador para marcar las sondas específicas de SNP. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes donadores de FRET adecuados y restos fluorescentes aceptadores correspondientes.

Los artículos de fabricación también pueden contener instrucciones de uso o una ficha técnica que tiene instrucciones en la misma para usar los cebadores y las sondas para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasas, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la presente invención se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO I

Detección de SNP por TaqMan® para MTB-RIF

La tuberculosis (TB) es un trastorno pulmonar grave comúnmente provocado por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) u otros miembros del complejo de MTB. Las cepas de MTB resistentes a los fármacos están creciendo y una forma particularmente peligrosa de tuberculosis resistente a los fármacos es la tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB). La MDR-TB se define como MTB que ha desarrollado resistencia a al menos dos de los fármacos antituberculosos más comúnmente usados, la rifampicina y la isoniazida. Aproximadamente un 83-87 % de la resistencia a la rifampicina está provocada por un polimorfismo mononucleotídico dentro de la región de determinación de la resistencia a la rifampicina (RRDR) de 81 pares de bases del gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa. Se diseñaron sondas de hidrólisis TaqMan® específicas mutantes con un fluoróforo en el extremo 5' y un extintor interno. Además de eso, se introdujeron base/bases adicionales en el extremo 3' de la sonda que daría como resultado una estructura de horquilla hacia el extremo 3'. La sonda se diseñó para que el emparejamiento incorrecto entre WT y MT se encuentre entre el indicador y el extintor cerca del extremo 5'. Cuando la sonda TaqMan® está intacta, el indicador y el extintor permanecen cerca uno del otro, lo que previene la emisión de toda fluorescencia.

El cebador y la sonda TaqMan® se hibridan con la hebra de ADN complementaria seguidamente de la desnaturalización durante la PCR. Después de la hibridación y durante la fase de extensión de la PCR, la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de la ADN polimerasa escinde la sonda que separa los colorantes indicador y extintor y se detecta la fluorescencia. La estructura de horquilla cerca del extremo 3' de la sonda retrasa la hibridación de la mitad 3' de la sonda con el molde y, por lo tanto, ayuda a discriminar la diana WT y MT basándose en la única diferencia o emparejamiento incorrecto del par de bases. La mitad 5' de la sonda TaqMan® de horquilla MT se hibridará más

eficazmente con el molde de ADN de plásmido MT en comparación con el molde WT. Cuando la sonda específica de MT encuentra la diana WT, el único emparejamiento incorrecto con la diana WT prevendrá la hibridación y la escisión de la sonda y no se detectará fluorescencia.

5 **Materiales y procedimientos**

Diana de ADN - plásmidos naturales (WT) y mutantes (MT)

10 ADN de plásmido MT y WT: entradas sometidas a prueba que varían de 1e6 cp/PCR a 10 cp/PCR mostradas en la tabla I que muestran una porción de la región de determinación de la resistencia a la rifampicina (RRDR) del gen *rpoB* en *Mycobacterium tuberculosis*.

TABLA I: ADN de plásmido natural y mutante

SEQ ID NO		SECUENCIA
5	Plásmido MT con SNP 526N	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGTCCAGAAC AACCCGCTGTCGGGGTTGACCAACAAGCG CCGACTGTCGGCGCTGGGGTCCGGCGG
6	Plásmido WT	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAAC AACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCCGGCGG
7	Plásmido MT para SNP 531L	GCCAGCTGAGCCTATTCATGGACCAGAAC AACCCGCTGCAGGGGTTGACCCACAAGCG CCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCCGGCGG
8	Plásmido WT	GCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAAC AACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCCGGCGG

15 Oligonucleótidos específicos de MTB: Un conjunto de cebadores directos e inversos para plásmidos tanto naturales como mutantes
Se muestran sondas TaqMan® de horquilla específicas de mutante en la tabla II

20 **TABLA II: Sondas específicas de SNP con y sin estructura de horquilla**

SEQ ID NO		SECUENCIA
1	Sonda (SNP 526N) con horquilla en 3'	5'-FTTGTTGQGTCAACCCCGAC GGGG P-3'
2	Sonda (SNP 526N) sin horquilla en 3'	5'-FTTGTTGQGTCAACCCCGACGP-3'
3	Sonda (SNP 531L) con horquilla en 3'	5'-FTTGGCQGCTGGGGCCCC C P-3'
4	Sonda (SNP 531L) sin horquilla en 3'	5'-FTTGGCQGCTGGGGCCCCGP-3'

Denominaciones: F significa treo-FAM; P significa fosfato; Q significa extintor BHQ-2; y las letras subrayadas en negrita son bases que se cambian o se añaden para formar una horquilla.

25 Plataformas: Sistema LightCycler® 480

Las amplificaciones de PCR en tiempo real se realizaron usando un conjunto de cebadores directos e inversos y

5 sondas TaqMan® con una estructura de horquilla en el extremo 3'. Se sometió a prueba el ADN de plásmido natural o mutante a 1e6, 1e2, 1e3 y 1e1 cp/PCR. El volumen de la reacción de PCR fue de 50 ul, y los componentes de la mezcla maestra y las condiciones del perfil térmico se enumeran a continuación. Las amplificaciones se realizaron en la plataforma LC480 y las curvas de crecimiento de PCR se analizaron usando el programa informático de análisis de datos ATF. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 8. Todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
 F. Hoffmann-La Roche AG
 Roche Molecular Systems, Inc.

<120> DETECCIÓN DE POLIMORFISMO MONONUCLEOTÍDICO USANDO SONDA DE HIDRÓLISIS CON ESTRUCTURA DE HORQUILLA EN 3'

10 <130> P31777-WO-HS

<150> US 14/106456
 <151> 13-12-2013

15 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 1
ttggttggtca accccgacgg gg **22**

30 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 2
ttggttggtca accccgacg **19**

40 <210> 3
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 3
ttggcgctgg ggcccc **16**

50 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido

60 <400> 4
ttggcgctgg ggcccc **16**

<210> 5
 <211> 85
 <212> ADN

65

ES 2 663 803 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 5
 <400> 5
 gccagctgag ccaattcatg gtccagaaca acccgctgtc ggggttgacc aacaagcgcc 60
 gactgtcggc gctgggggcc ggcgg 85
 <210> 6
 10 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido
 <400> 6
 gccagctgag ccaattcatg gaccagaaca acccgctgtc ggggttgacc cacaagcgcc 60
 gactgtcggc gctgggggcc ggcgg 85
 20 <210> 7
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 7
 gccagctgag cctattcatg gaccagaaca acccgctgca ggggttgacc cacaagcgcc 60
 gactgttggc gctgggggcc ggcgg 85
 30 <210> 8
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 8
 gccagctgag ccaattcatg gaccagaaca acccgctgtc ggggttgacc cacaagcgcc 60
 40 gactgtcggc gctgggggcc ggcgg 85

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 5 - realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un cebador que comprende una primera secuencia de ácido nucleico para producir un producto de amplificación si está presente algún ácido nucleico diana en la muestra;
- 10 - realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de hidrólisis específica de SNP que tiene un extremo 5' y un extremo 3',
- 15 teniendo dicha sonda de hidrólisis específica de SNP una secuencia de ácido nucleico que consiste en una estructura de horquilla hacia el extremo 3' y una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene el SNP del producto de amplificación;
- comprendiendo además dicha sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, en la que dicho primer marcador interactivo comprende un resto fluorescente donador en el extremo 5', y dicho segundo marcador interactivo comprende un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis y en la que el nucleótido dentro de la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis que hibrida con el SNP en el producto de amplificación está situado entre el primer y el segundo marcador interactivo; y
- 20 comprendiendo dicha estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales para producir la estructura de horquilla en el extremo 3' y en la que dichos uno o más nucleótidos no naturales son nucleótidos añadidos o cambiados en el extremo 3' de la sonda de hidrólisis en comparación con la secuencia natural del producto de amplificación; y
- 25 - detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en el que la presencia de los productos de amplificación es indicativa de la presencia del SNP en la diana de ácido nucleico, y en el que la ausencia de los productos de amplificación es indicativa de la ausencia del SNP en la diana de ácido nucleico.
- 30
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el resto fluorescente aceptador es un extintor.
- 35
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprenden al menos un nucleótido modificado.
- 40
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis tienen 40 o menos nucleótidos.
- 45
6. Un kit para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:
- al menos un cebador que comprende una primera secuencia de ácido nucleico específica para producir un producto de amplificación del ácido nucleico diana; y
- 50 - una sonda de hidrólisis específica de SNP que tiene un extremo 5' y un extremo 3',
- teniendo dicha sonda de hidrólisis específica de SNP una secuencia de ácido nucleico que consiste en una estructura de horquilla hacia el extremo 3' y una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene el SNP del producto de amplificación;
- 55 comprendiendo además dicha sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, en la que dicho primer marcador interactivo comprende un resto fluorescente donador en el extremo 5', y dicho segundo marcador interactivo comprende un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis y en la que el nucleótido dentro de la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis que hibrida con el SNP en el producto de amplificación está situado entre el primer y el segundo marcador interactivo; y
- 60 comprendiendo dicha estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales para producir la estructura de horquilla en el extremo 3' y en la que dichos uno o más nucleótidos no naturales son nucleótidos añadidos o cambiados en el extremo 3' de la sonda de hidrólisis en comparación con la secuencia natural del producto de amplificación.
- 65

7. El kit de la reivindicación 6, en el que el resto fluorescente aceptador es un extintor.
- 5 8. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende además una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'.
9. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprenden al menos un nucleótido modificado.
- 10 10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la primera secuencia de ácido nucleico del cebador y/o la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis tienen 40 o menos nucleótidos.
11. Una sonda de hidrólisis específica de SNP que tiene un extremo 5' y un extremo 3',
- 15 teniendo dicha sonda de hidrólisis específica de SNP una secuencia de ácido nucleico que consiste en una estructura de horquilla hacia el extremo 3' y una secuencia de ácido nucleico complementaria a una región que contiene el SNP de un producto de amplificación;
- 20 comprendiendo además dicha sonda de hidrólisis específica de SNP un primer y un segundo marcador interactivo, en la que dicho primer marcador interactivo comprende un resto fluorescente donador en el extremo 5', y dicho segundo marcador interactivo comprende un resto fluorescente aceptador correspondiente, a no más de 5 nucleótidos del resto fluorescente donador en la sonda de hidrólisis y en la que el nucleótido dentro de la segunda secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis que hibrida con el SNP en el producto de amplificación está situado entre el primer y el segundo marcador interactivo; y
- 25 comprendiendo dicha estructura de horquilla una región de secuencia de ácido nucleico no natural que comprende uno o más nucleótidos no naturales para producir la estructura de horquilla en el extremo 3' y en la que dichos uno o más nucleótidos no naturales son nucleótidos añadidos o cambiados en el extremo 3' de la sonda de hidrólisis en comparación con la secuencia natural del producto de amplificación.
- 30 12. La sonda de hidrólisis específica de SNP de la reivindicación 11, en la que el resto fluorescente aceptador es un extintor.
- 35 13. La sonda de hidrólisis específica de SNP de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en la que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de hidrólisis comprende al menos un nucleótido modificado.
14. La sonda de hidrólisis específica de SNP de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que la sonda de hidrólisis tiene 40 o menos nucleótidos.

40

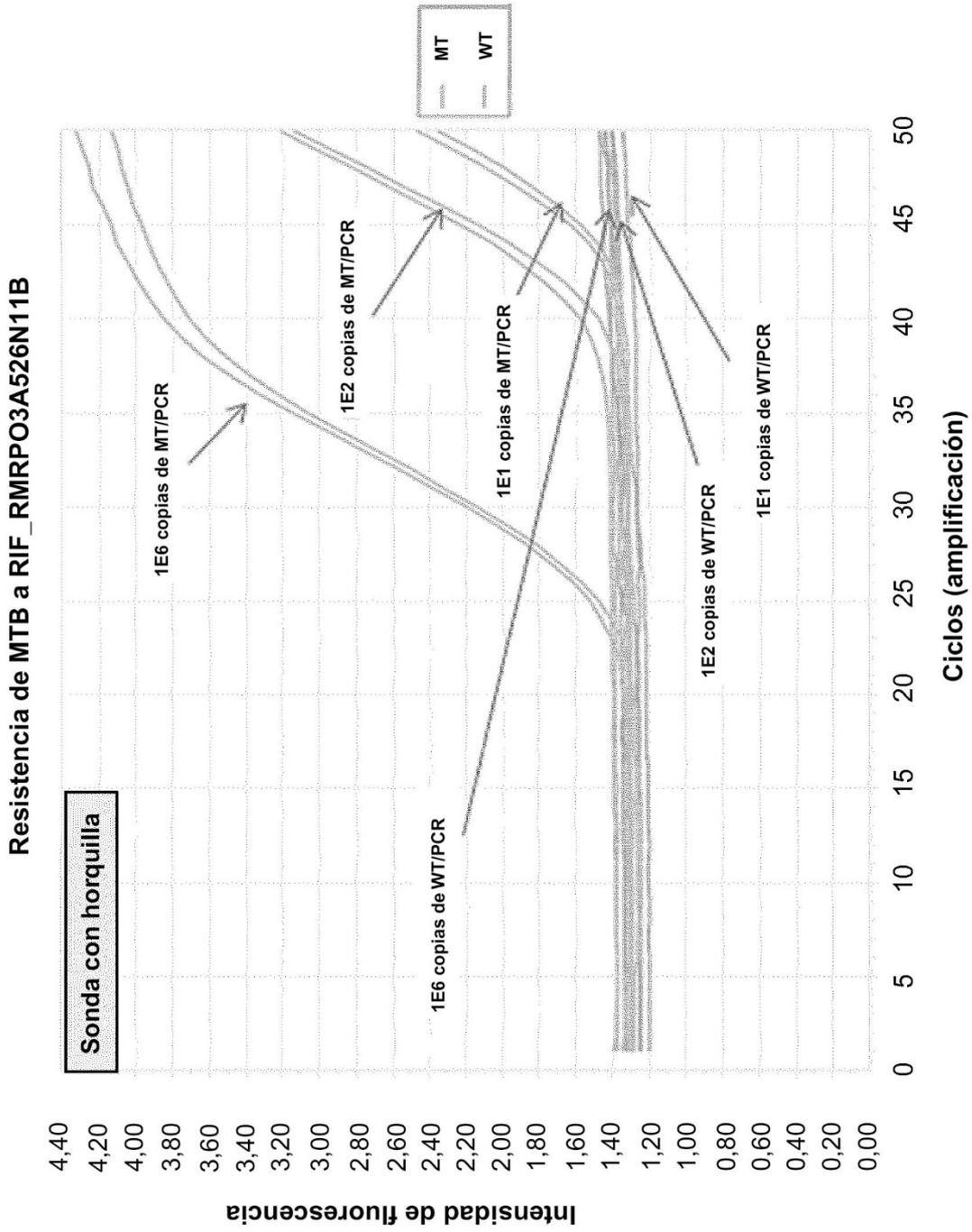


Fig. 1

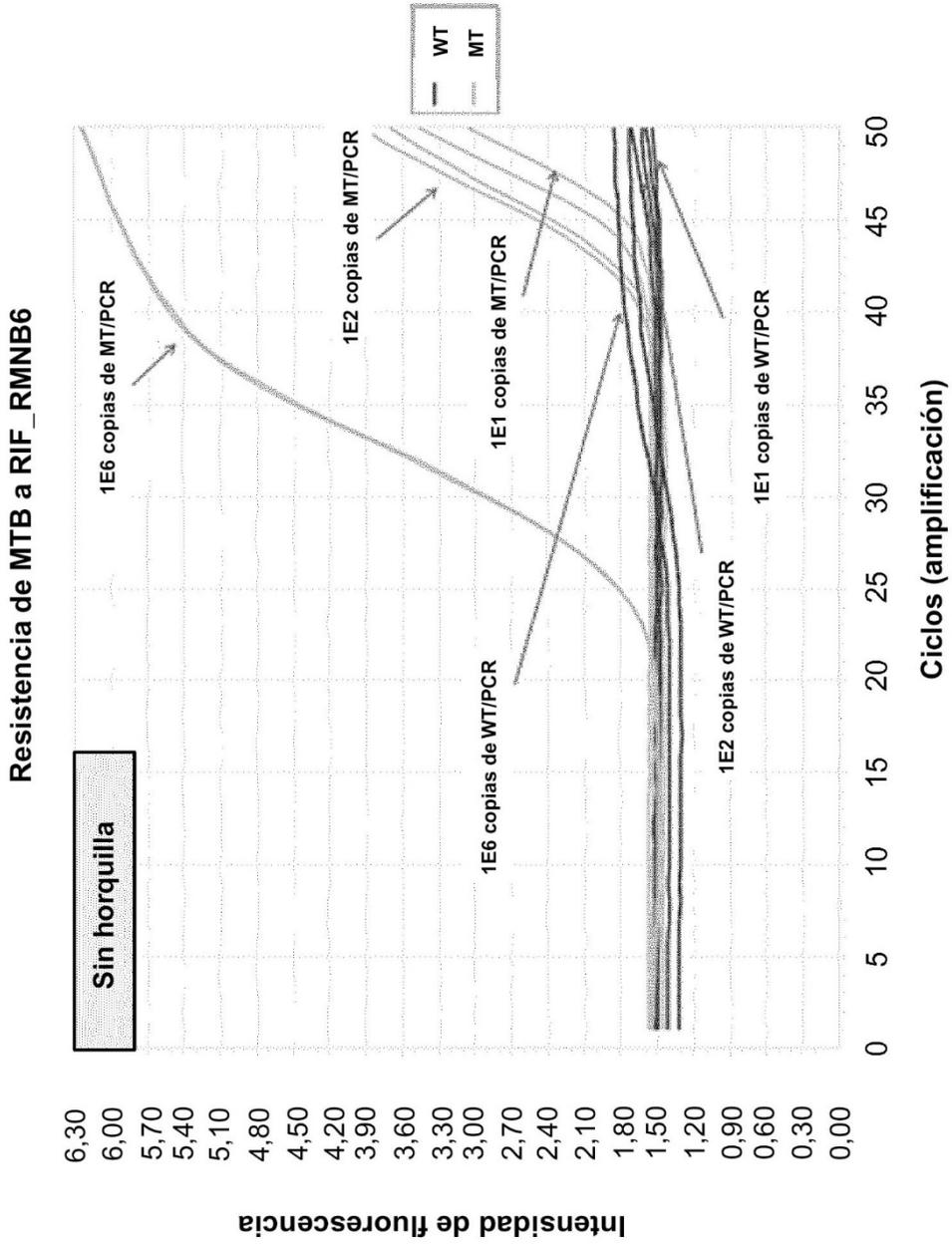


Fig. 4

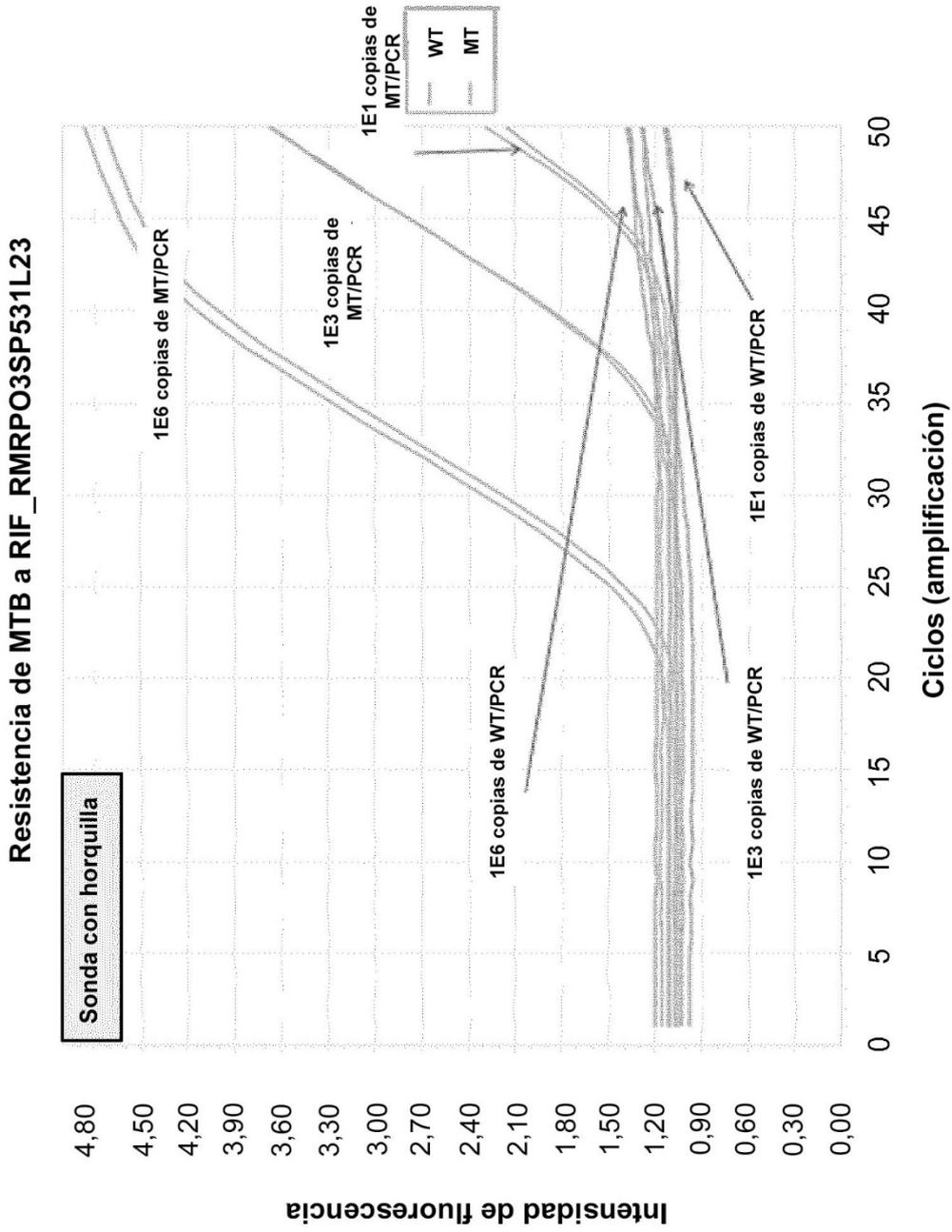


Fig. 5

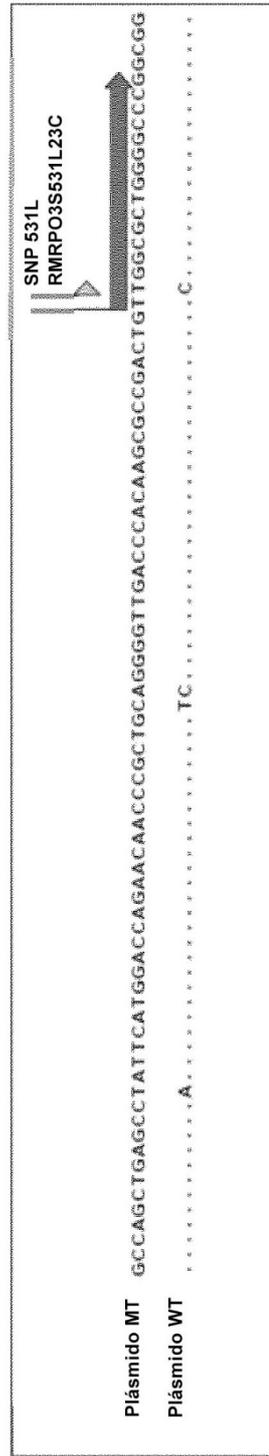


Fig. 6

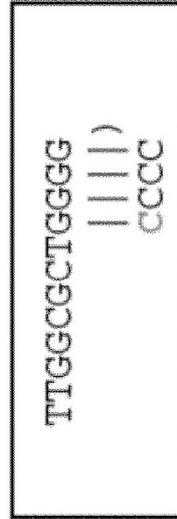


Fig. 7

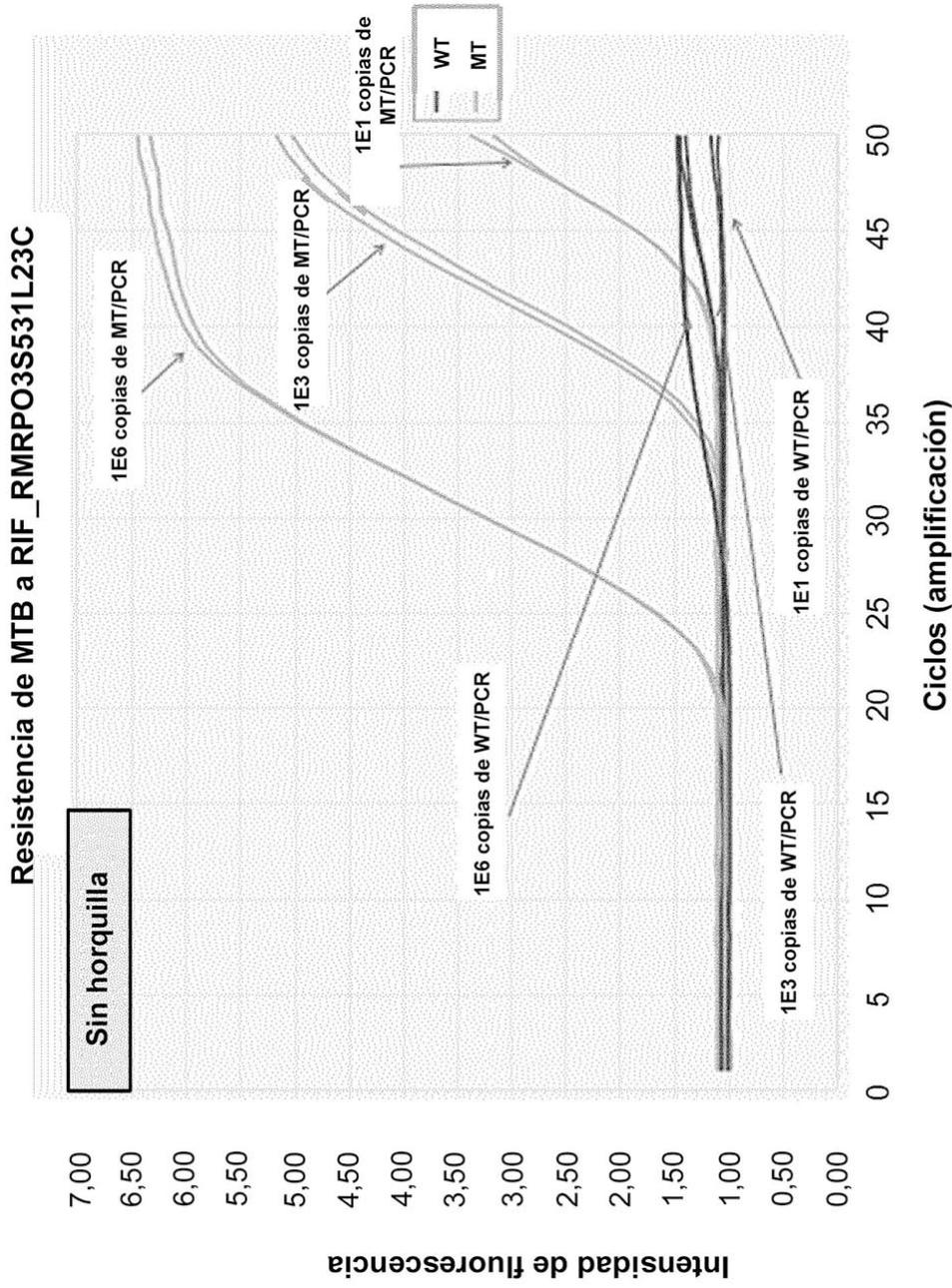


Fig. 8