

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 725**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6818** (2008.01)

**C12Q 1/6832** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2012 PCT/US2012/048920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13028316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2012 E 12824985 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2748320**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la hibridación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**24.08.2011 US 201161526773 P**

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

**12.07.2018**

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)  
4101 Research Commons 79 T.W. Alexander  
Drive  
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**WRONSKA, DANUTA y  
SCHOUEST, KATHERINE**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 675 725 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**

Composiciones y procedimientos para la hibridación de ácidos nucleicos

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al sector de los procedimientos y ensayos que implican la hibridación de ácidos nucleicos.

10 **ANTECEDENTES**

Las sondas de doble marcado (DLP, de "dual-labelled probe") incluyen polinucleótidos marcados en un extremo con un colorante fluorescente (informador) y en el extremo opuesto con una molécula desactivadora de la fluorescencia. Estas sondas se utilizan con frecuencia en diferentes ensayos de hibridación entre los que se incluyen PCR en tiempo real. En los procedimientos que utilizan DLP, cuando la desactivadora de la sonda está físicamente cerca del informador, la fluorescencia se desactiva mediante mecanismos físico-químicos de los que el FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) es el más común.

La eficiencia de desactivación de un desactivador puede disminuir rápidamente con el aumento de la distancia entre el informador y el desactivador. La distancia entre el desactivador y las moléculas informadoras en una molécula DLP única libre (no enlazada) intacta, en parte, puede ser dependiente de la estructura secundaria de la DLP que depende de la secuencia de la sonda. Aquellas DLP con más estructura secundaria pueden existir en una conformación superenrollada en la que el desactivador y el informador están muy próximos y la eficiencia de desactivación es elevada. Se supone que aquellas DLP con poca o ninguna estructura secundaria han de existir en una conformación más relajada, en la que el desactivador y el informador están más separados y se reduce la eficiencia de desactivación. Las DLP con una eficiencia de desactivación inferior pueden tener un fondo fluorescente elevado debido a que cierta cantidad de fluorescencia del informador "se escapa" del efecto del desactivador. Un fondo fluorescente elevado no es deseable en ensayos de PCR en tiempo real ya que, por ejemplo, se obtiene una baja proporción de señal a ruido, dando como resultado una baja sensibilidad del ensayo o una deriva de la señal por la que la señal fluorescente de muestras negativas cruza el umbral. Cuando la señal de una muestra investigada cruza el umbral, se le asigna un valor  $C_T$ . En el análisis automatizado de datos en el que la discriminación de muestras se basa en valores  $C_T$ , las muestras negativas que muestran deriva de la señal pueden ser clasificadas como positivas provocando un trabajo extra innecesario.

Una forma de evitar las DLP con fondo fluorescente elevado es utilizar sondas dobles universales enlazadas (AUDP, de "attached universal duplex probes"), tal como se ha descrito en la bibliografía, en lugar de DLP. En las AUDP, el informador y desactivador están unidos respectivamente a los extremos -5' y -3' de 2 moléculas diferentes del complejo de la sonda que están unidas entre sí. De este modo, el informador y el desactivador están siempre muy próximos hasta que la sonda que lleva el desactivador se desplaza y se libera la fluorescencia. Sin embargo, debido a su carácter universal, las AUDP no ofrecen la entrada de especificidad adicional para los ensayos de PCR que ofrecen las DLP.

El documento WO 2006/045009 da a conocer composiciones y procedimientos para la detección y medición de ácidos nucleicos dianas. Las sondas que se dan a conocer en dicho documento comprenden un complejo de tres sondas de oligonucleótidos que incluyen: una primera sonda de oligonucleótidos, una segunda sonda de oligonucleótidos y una sonda de oligonucleótidos de puente. En la mayoría de los aspectos, la primera y la segunda sondas hibridan preferentemente con los oligonucleótidos de puente en ausencia de un ácido nucleico diana. La primera sonda contiene un miembro de un par interactivo de marcadores y la segunda sonda contiene el otro miembro del par interactivo de marcadores.

Existe la necesidad de superar las limitaciones, discutidas anteriormente, de las sondas y ensayos de hibridación convencionales, particularmente, la necesidad de dar a conocer composiciones, procedimientos y kits que sean eficaces para mejorar el rendimiento de las sondas de ácidos nucleicos, en particular de las sondas de ácidos nucleicos de doble marcado.

55 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

En un aspecto, la presente invención da a conocer el uso de una composición que comprende:

60 a) una envoltura de sonda para la hibridación a una sonda de ácido nucleico en la que la envoltura de sonda comprende un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero; y

65 b) una sonda de ácido nucleico para la detección de una secuencia diana en la que la sonda comprende un par FRET, en la que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda;

en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo segmento de sonda;

5 en el que la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del complejo sonda/diana es mayor que la temperatura de fusión del complejo sonda/envoltura de sonda, para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición que comprende:

10 a) una envoltura de sonda para la hibridación a una sonda de ácido nucleico en la que la envoltura de sonda comprende un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero; y

15 b) una sonda de ácido nucleico para la detección de una secuencia diana en la que la sonda comprende un par FRET, en la que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda;

20 en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es de 90% a 96% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, y en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es de 90% a 96% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo segmento de sonda;

En algunos aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para la determinación de la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra. El procedimiento comprende:

25 a) determinar la señal de fluorescencia en un primer nivel a una temperatura de detección cuando una sonda se hibrida a una envoltura de sonda;

30 b) poner en contacto la muestra con la sonda en presencia de la envoltura de sonda, en el que la envoltura de sonda tiene un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero, en el que la sonda es una sonda de ácido nucleico para la detección de un ácido nucleico diana, en la que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo segmento de sonda, en el que la sonda comprende además un par FRET, en el que el primer y el segundo segmentos de sonda son capaces de hibridar con el primer y el segundo segmentos de envolturas de sondas respectivamente, en ausencia de un ácido nucleico diana para formar un complejo sonda/envoltura de sonda, en el que en presencia del ácido nucleico diana, la sonda es capaz de hibridar preferentemente con el ácido nucleico diana para formar un complejo sonda/complejo diana.

40 c) determinar el cambio de la señal de fluorescencia de la sonda a la temperatura de detección;

45 en el que el fluoróforo tiene una señal de fluorescencia a un primer nivel cuando la envoltura de la sonda se hibrida con la sonda; en el que la señal de fluorescencia es mayor que la del primer nivel cuando el ácido nucleico diana está presente en la muestra.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

50 La figura 1 es una representación esquemática de una realización de una "envoltura de sonda" de la presente invención hibridada con una sonda.

La figura 2 es una representación esquemática de algunas realizaciones de la presente invención: una sonda que tiene una secuencia tal como la que expone en SEC ID No. 1 se representa con una envoltura de sonda que tiene una secuencia tal como la que expone en la SEC ID No. 2. Fluoróforo ◊; Desactivador ●.

La figura 3 es una representación esquemática que muestra, en una realización, una envoltura de sonda y una sonda, en la que la sonda se hibrida con una secuencia diana.

#### 60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención da a conocer un polinucleótido (en el presente documento también denominado como una "envoltura de sonda" o "probe wrapper") para la hibridación con una sonda de ácido nucleico utilizada para la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana. Generalmente, la envoltura de sonda hibrida, en condiciones definidas, tanto con regiones cadena arriba como cadena abajo de la sonda de ácido nucleico.

La figura 1 ilustra esquemáticamente una realización de la envoltura de sonda -1- hibridada con una DLP -2- mediante el emparejamiento de bases complementarias -3-. En la realización mostrada en la figura 1, la envoltura de sonda es un polinucleótido monocatenario que tiene un primer segmento de polinucleótido -4- contiguo a un segundo segmento de polinucleótido -5- que está cadena abajo del primero -4-. La secuencia del primer segmento de polinucleótido -4- es complementaria a una primera secuencia de la sonda que define un primer segmento de sonda -6- de la sonda -2- que comprende, además, un segundo segmento de sonda -7- cadena abajo respecto al primer segmento de sonda -6-, comprendiendo además el segundo segmento de sonda -7- una secuencia de ácido nucleico. La secuencia del segundo segmento de polinucleótido -5- de la envoltura de sonda -1- es complementaria a la secuencia del segundo segmento de sonda -7- de la sonda -2-. En la figura 1, la sonda -2- se representa comprendiendo, además, un informador -8- y un desactivador -9- en sus extremos -5'- y -3'-, respectivamente.

En general, el primer segmento de sonda, el segundo segmento de sonda, o ambos, son total o suficientemente complementarios a una secuencia diana para permitir la hibridación de la sonda con la diana de una forma específica de secuencia.

Aunque, en algunas realizaciones, las secuencias del primer y segundo segmentos de polinucleótido de envoltura de sonda son totalmente complementarias a las secuencias del primer y segundo segmentos de una sonda, en otras realizaciones, la hibridación de una envoltura de sonda con una sonda no se limita a una hibridación de sus respectivos segmentos mediante secuencias que son totalmente complementarias. En otras palabras, las secuencias de los segmentos de hibridación pueden no ser necesariamente totalmente complementarias, siempre y cuando el polinucleótido (es decir, la envoltura de sonda) se una específicamente a la sonda; pueden contener una o más bases universales, por ejemplo, inosina o 5-nitroindol; y pueden contener parcialmente una base o una secuencia que no es complementaria.

En una realización, la secuencia del primer segmento de polinucleótido de envoltura de sonda es homóloga a la complementaria inversa de la secuencia del primer segmento de sonda. En otra realización, un porcentaje de homología entre la secuencia del primer segmento de polinucleótido y la complementaria inversa de la secuencia del primer segmento de sonda es, como mínimo, aproximadamente el 90%, de forma ilustrativa, de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 100%, y de aproximadamente el 94 a aproximadamente el 96%. En algunas realizaciones, la secuencia del primer segmento de polinucleótido es la complementaria inversa de la secuencia del primer segmento de sonda.

En otra realización, la secuencia del segundo segmento de polinucleótido de envoltura de sonda es homóloga a la complementaria inversa de la secuencia del segundo segmento de sonda de la sonda. En otra realización, un porcentaje de homología entre la secuencia del segundo segmento de polinucleótido y la complementaria inversa de la secuencia del segundo segmento de sonda es, como mínimo, aproximadamente, el 90%, de forma ilustrativa, de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 100%, y de aproximadamente el 94 a aproximadamente el 96%. En algunas realizaciones, la secuencia del segundo segmento de polinucleótido es la complementaria inversa de la secuencia del segundo segmento de sonda.

En realizaciones preferentes, la envoltura de sonda es capaz de hibridar con una DLP que tiene un informador y un desactivador. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la DLP es un polinucleótido monocatenario marcado en un extremo con un colorante fluorescente (informador) y en el extremo opuesto con una molécula desactivadora. Sin querer unirse a ninguna teoría particular, se cree que cuando el desactivador está físicamente cerca del informador, la fluorescencia se extingue por mecanismos físico-químicos de los cuales la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET) es el más habitual. La envoltura de sonda de la presente invención puede hibridar, en condiciones definidas, con ambos segmentos cadena arriba y cadena abajo de la DLP posicionando de este modo al informador y al desactivador muy próximos entre sí (figura 1). Esta "envuelta" puede aumentar la eficiencia de extinción de fluorescencia por la molécula desactivadora, reduciendo de este modo el fondo fluorescente de la DLP en forma libre (es decir, no restringida o no acoplada en la detección de diana) por ejemplo, durante la etapa de detección de un ciclo de PCR. Esto se traduce en la eliminación o reducción significativa de la deriva de la señal que puede causar un resultado falso positivo. Además, la interacción entre la DLP y la envoltura de sonda es reversible - por ejemplo, las moléculas se separan durante la etapa de desnaturalización en un ciclo de PCR asegurando la disponibilidad de la DLP para el siguiente ciclo de detección de dianas.

En el diseño de la envoltura de sonda, por ejemplo, para su utilización con una DLP con marcadores interactivos (por ejemplo, informador/desactivador), los segmentos cadena arriba y cadena abajo (es decir, el primer y segundo segmentos de polinucleótido, respectivamente) de la envoltura de sonda deben ser de una longitud suficiente para que, en las condiciones de ensayo y a una temperatura de detección, cuando la DLP no está enlazada a un objetivo, la envoltura de sonda y la sonda estén asociados y los restos marcadores de la sonda se mantengan muy próximos entre sí. Dependiendo de las condiciones de ensayo utilizadas, cada uno de los primer y segundo segmentos de polinucleótido de la envoltura de sonda, de forma independiente, pueden tener, como mínimo, aproximadamente 3 nucleótidos de longitud, de forma ilustrativa, de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 5 a 30 nucleótidos, de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 y de aproximadamente 11 a aproximadamente 15 nucleótidos. En una realización, cada segmento, independientemente, es de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 nucleótidos de longitud. Además, segmentos de la envoltura de sonda de grandes

longitudes (por ejemplo, mayor de aproximadamente 50 nucleótidos) se pueden emplear también en función de las condiciones de ensayo, incluyendo la sonda y/o secuencias diana. La longitud real de cada segmento de polinucleótido de una envoltura de sonda se puede elegir en referencia a la sonda y/o secuencias diana, de tal manera que la sonda permanezca unida a la envoltura de sonda en ausencia de diana durante una etapa de detección.

Para la envoltura de sonda/sonda representados en la figura 2, el primer y segundo segmentos de polinucleótido de la envoltura de sonda se muestran, cada uno, con una longitud de 11 nucleótidos que son totalmente complementarios a los respectivos segmentos de sonda, que es un polinucleótido monocatenario que tiene una longitud total de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la envoltura de sonda se une a una DLP que tiene un solo par de restos marcadores. En otras realizaciones, la DLP tiene más de un par de restos marcadores. Además, no hay ningún requisito para una correspondencia molecular uno a uno entre los miembros de un par marcador, especialmente cuando un miembro puede afectar, o estar afectado por, más de una molécula del otro miembro. Los restos marcadores pueden interactuar de forma que, como mínimo, un resto puede alterar, como mínimo, una característica física medible de otro resto marcador de una forma dependiente de proximidad. La señal característica del par marcador es de forma detectable diferente dependiendo de si la sonda se enlaza a la envoltura de sonda o a la diana. En algunas realizaciones, un par marcador comprende un resto fluorescente emparejado con dos o más restos de extinción.

Por ejemplo, en referencia a la figura 1, los restos marcadores preferentes son un único par FRET, más preferentemente un fluoróforo -8- y desactivador -9-. En esa realización, la señal característica es la fluorescencia de una longitud de onda determinada. Cuando la sonda se une a la envoltura de sonda, el resto desactivador es capaz de extinguir la fluorescencia del resto informador, en el que si el resto informador se estimula mediante una frecuencia adecuada de luz, una señal fluorescente se determina en un primer nivel, que puede ser relativamente bajo o aproximadamente nulo. Cuando la sonda no está enlazada a una envoltura de sonda, el resto desactivador es incapaz de extinguir la fluorescencia del resto informador tan eficientemente como en el caso en el que la sonda y la envoltura de sonda están unidos entre sí, en el que si el resto informador se estimula mediante una frecuencia apropiada de luz, se puede determinar una señal fluorescente en un segundo nivel que, preferentemente, es mayor que el primer nivel. Además, si una secuencia diana está presente, se puede determinar una señal en un tercer nivel, en el que el tercer nivel es mayor que el primer o el segundo nivel.

En algunas realizaciones, la envoltura de sonda, durante condiciones de ensayo, se une reversiblemente de forma suficientemente fuerte a la sonda en condiciones de detección en ausencia de la secuencia diana, pero de forma suficientemente débil para que la hibridación de la sonda y su secuencia diana, si está presente, esté favorecida termodinámicamente respecto a la interacción de la envoltura de sonda con la sonda.

En algunas realizaciones, entre los colorantes fluorescentes se incluyen, pero sin que constituyan limitación, FAM, BODIPY FL, Cy3<sup>®</sup>, Cy3.5<sup>®</sup>, Cy5<sup>®</sup>, Cy5.5<sup>®</sup>, EDANS, fluoresceína, HEX, IAEDANS, JOE, Oregon Green<sup>®</sup>, (LC)Red640, (LC)Red705, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina, Texas Red<sup>®</sup> o combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, entre los colorantes desactivadores se incluyen, pero sin que constituyan limitación, BHQ-1<sup>®</sup>, BHQ-2<sup>®</sup>, BHQ-3<sup>®</sup>, DABCYL, agregados metálicos, tales como nanopartículas de oro, y QSY7<sup>®</sup>.

En una realización, entre los marcadores interactivos se incluyen, pero sin que constituyan limitación, pares donador/aceptor tales como, por ejemplo, FAM/BHQ-1, fluoresceína/tetrametilrodamina, fluoresceína/fluoresceína, fluoresceína/QSY7, fluoresceína/LC RED640, fluoresceína/LC Red705 IAEDANS/fluoresceína, EDANS/DABCYL, BODIPY FL/BODIPY FL, TET/BHQ-1, JOE/BHQ-1, HEX/BHQ-1, Oregon Green/BHQ-1, TAMRA/BHQ-2, ROX/BHQ-2, Cy3/BHQ-2, Cy3.5/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Cy5/BHQ-3 y Cy5.5/BHQ-3.

En algunas realizaciones, la sonda comprende, además, otros pares de marcadores útiles incluyendo una enzima informadora y el inhibidor apropiado.

En otra realización, la envoltura de sonda es capaz de hibridar con una DLP que tiene el extremo -5'- y el -3'- marcados con un grupo FAM y un BHQ1, respectivamente.

Aunque el segundo segmento es contiguo al primer segmento e inmediatamente cadena abajo del mismo, tal como se muestra en la figura 1, en otras realizaciones, la envoltura de sonda puede comprender, además, un espaciador entre el primer segmento de polinucleótido y el segundo segmento de polinucleótido.

En la presente memoria descriptiva, el término "espaciador" se refiere a una molécula que tiene un primer extremo unido al primer segmento de polinucleótido y un segundo extremo unido al segundo segmento de polinucleótido de la envoltura de sonda. De este modo, la molécula espaciadora separa el primer y el segundo segmentos, pero está unida a ambos. Los espaciadores se pueden sintetizar directamente o, preferentemente, enlazarse como un todo a la envoltura de sonda en lugares específicos. Entre los enlaces dentro del espaciador se pueden incluir, pero sin que constituyan limitación, enlaces sencillos carbono-carbono, enlaces dobles carbono-carbono, enlaces sencillos

5 carbono-nitrógeno, o enlaces sencillos carbono-oxígeno. Entre los espaciadores adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen, por ejemplo, nucleótidos que contienen adenina, guanina, citosina y timina como bases y desoxirribosa como el elemento estructural. Además, un nucleótido puede, sin embargo, comprender también cualquier base artificial conocida en la técnica, que sea capaz de apareamiento de bases utilizando, como

10 mínimo, una de las bases antes mencionadas (por ejemplo, inosina). Los espaciadores preferentes comprenden también espaciadores de timidina, que pueden tener una longitud variable. El espaciador puede contener, además, grupos reactivos adecuados, preferentemente en cada extremo para la conexión al primer y segundo segmentos. Estos grupos reactivos pueden comprender, por ejemplo, grupos hidroxilo, tiol, aldehído, amida y tioamida. Además, el espaciador puede tener cadenas laterales u otras sustituciones. El grupo activo se puede hacer reaccionar mediante

15 procedimientos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, preferentemente un enlace covalente entre el espaciador y un segmento de la envoltura de sonda para formar una única molécula de envoltura de sonda contigua que tiene el espaciador entre el primer y el segundo segmentos de envoltura de sonda.

En una realización, la envoltura de sonda tiene un extremo -3'- que se ha modificado para evitar la extensión de polimerasa mediante una polimerasa. En otra realización, la envoltura de sonda comprende un extremo terminal -3'- modificado con un grupo fosfato, un éster de fosfato o un enlace -3'-3'- invertido. Otros procedimientos y tipos de bloqueo son conocidos por el experto en la materia y pueden utilizarse fácilmente con la envoltura de sonda para evitar la extensión de polimerasa de su extremo -3'-.

20 En la Tabla 1 se dan a conocer ejemplos no limitantes de envolturas de sonda y DLP.

Tabla 1: Ejemplos de secuencias de DLP y envolturas.

Función de oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótido (5 'a 3')
Sonda de detección de VIH 1	FAM/ACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT/BHQ-1 (SEC ID No. 1)
Sonda de detección de VIH 2	TCATTGATGGTATCCATTCTGfosfato (SEC ID No. 2)

25 Un experto en la materia reconocerá que el comportamiento de las moléculas de ácidos nucleicos en soluciones complejas no siempre se puede predecir con certeza, por lo tanto, las pruebas empíricas son muy útiles en la adaptación de las envolturas de sonda y/o sondas según la presente invención para que funcionen óptimamente en las condiciones particulares de ensayo.

30 En otros aspectos, la presente invención da a conocer una composición que comprende la envoltura de sonda y la sonda, tal como se define en la reivindicación 5.

En algunas realizaciones, la composición comprende:

35 a) una envoltura de sonda, en la que la envoltura de sonda es un polinucleótido que tiene un primer segmento de polinucleótido contiguo a un segundo segmento de polinucleótido que está cadena abajo del primero, y  
 b) una sonda de ácido nucleico para detectar una secuencia diana, en el que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda;

40 En algunas realizaciones, la secuencia del primer segmento de polinucleótido es complementaria a la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de polinucleótido es complementaria a la secuencia del segundo segmento de sonda.

45 En una realización, la secuencia del primer segmento de polinucleótido es la complementaria inversa de la secuencia del primer segmento de sonda. En otra realización, la secuencia del segundo segmento de polinucleótido de la envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga a la complementaria inversa de la secuencia del segundo segmento de sonda de la sonda.

50 En realizaciones preferentes, la cadena de ácido nucleico de la sonda, en condiciones de hibridación a una temperatura de detección, específicamente, se hibrida de forma reversible con la cadena de ácidos nucleicos de la envoltura de sonda en ausencia de una cadena de ácidos nucleicos diana para formar un complejo sonda/envoltura de sonda que tiene una  $T_m$  de sonda/envoltura de sonda, en el que, en presencia de la cadena de ácido nucleico diana, la cadena de ácido nucleico de la sonda preferentemente hibrida con la cadena de ácido nucleico diana para formar una  $T_m$  de sonda/diana.

55 Preferentemente, la  $T_m$  de sonda/diana es mayor que la  $T_m$  sonda/envoltura de sonda. En otra realización, la  $T_m$  de sonda/envoltura de sonda es mayor que la temperatura de detección.

60 En algunas realizaciones, en las que la sonda comprende un informador generador de señales (por ejemplo, un fluoróforo), se puede determinar una señal del informador en un primer nivel cuando la sonda hibrida con la envoltura de sonda. En otras realizaciones, el primer nivel es menor que una señal determinada donde está presente una secuencia diana.

En una realización, la sonda comprende, además, un informador y un desactivador.

5 Sin querer unirse a ninguna teoría particular, se cree que la separación de las cadenas de la sonda/envoltura de sonda está impulsada por la termodinámica de la formación de la hélice sonda/diana. La formación de la hélice sonda/diana puede superar la atracción del par sonda/envoltura de sonda en las condiciones de ensayo.

10 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, incluyendo las envolturas de sonda y las sondas, se pueden preparar a partir de ADN, ARN, o combinaciones de los mismos. Además, aparte de los segmentos de cadena sencilla que participan en la hibridación con las secuencias de la sonda, en otras realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos pueden comprender también regiones de ácidos nucleicos que son de doble cadena. Además, las moléculas de ácidos nucleicos pueden incluir nucleótidos modificados. Los enlaces internucleotídicos modificados son útiles en las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos para alterar, por ejemplo, la fuerza de hibridación y la resistencia a la degradación no específica y a las nucleasas. Los enlaces entre los nucleótidos pueden incluir enlaces que no sean enlaces fosfodiéster, por ejemplo, enlaces peptídicos. Los enlaces internucleotídicos modificados son bien conocidos en la técnica e incluyen metilfosfonatos, fosfortioatos, fosforditionatos, fosforamiditas y enlaces de ésteres de fosfato. También son conocidos los "enlaces sin fosfato", tales como puentes entre los nucleótidos e incluyen siloxano, carbonato, éster carboximetílico, acetamido, carbamato y puentes de tioéter. El "ADN plástico", que tiene enlaces internucleotídicos, por ejemplo, N-vinilo, metacriloxietilo, metacrilamida o etilenimina también se puede utilizar en las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención. "Ácido Nucleico Peptídico" (ANP) es particularmente útil debido a su resistencia a la degradación por nucleasas y porque forma un híbrido más fuerte con los ácidos nucleicos naturales.

25 En otros aspectos adicionales, la presente invención da a conocer un procedimiento para determinar la presencia, como mínimo, de una cadena de ácido nucleico diana en una muestra. El procedimiento comprende: poner en contacto la muestra con una sonda en presencia de un envoltura de sonda.

30 En una realización, la envoltura de sonda es un polinucleótido que tiene un primer segmento de polinucleótido contiguo a un segundo segmento de polinucleótido que está cadena abajo del primero y la sonda es una sonda de ácido nucleico para detectar una secuencia diana, en el que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda; en el que la secuencia del primer segmento de polinucleótido es complementaria a la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de polinucleótido es complementaria a la secuencia del segundo segmento de sonda, en el que la sonda comprende, además, un par FRET que comprende un fluoróforo y un desactivador.

35 En otra realización, el primer y segundo segmentos de sonda, en condiciones de hibridación a una temperatura de detección, son capaces de hibridar de forma específica y reversible, respectivamente, con el primer y segundo segmentos de polinucleótido de la envoltura de sonda, en ausencia de una cadena de ácido nucleico diana, para formar un complejo sonda/envoltura de sonda que tiene una  $T_m$  de sonda/envoltura de sonda, en el que, en presencia de la cadena de ácido nucleico diana, la sonda es capaz de hibridar preferentemente con la cadena de ácido nucleico diana para formar una  $T_m$  sonda/diana.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la determinación de un cambio en una señal de fluorescencia de la sonda a la temperatura de detección.

45 En otras realizaciones, se determina una señal de fluorescencia en un primer nivel a la temperatura de detección cuando la sonda hibrida con la envoltura de sonda, en la que la señal de fluorescencia a la temperatura de detección es mayor que el primer nivel en el que la cadena de ácido nucleico diana está presente en la muestra.

50 En otras realizaciones más, los ensayos de acuerdo con la presente invención pueden ser multiplexados, es decir, puede ser detectado más de un analito de ácido nucleico diana en un ensayo. Típicamente, en un ensayo múltiple, se añade a la mezcla que ha de ensayarse más de una sonda específica de ácido nucleico que difiere en la naturaleza de sus colorantes enlazados covalentemente. Los colorantes se pueden seleccionar para producir señales fluorescentes distinguibles a partir de cada sonda específica de ácido nucleico. Las señales de las diferentes combinaciones de colorantes de las sondas de ácidos nucleicos se pueden registrar simultáneamente para detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos diana correspondientes al mismo tiempo.

60 En una realización, el procedimiento es PCR en tiempo real. En otra realización, el procedimiento es un ensayo multiplexado que incluye múltiples envolturas de sonda, sondas y/o dianas en el mismo ensayo. En algunas realizaciones, el procedimiento es PCR multiplexado en tiempo real que incluye dos o más sondas diferentes y sus correspondientes envolturas de sonda, según la presente invención.

65 Además de los ensayos homogéneos, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden, en otras realizaciones, utilizarse en ensayos que se llevan a cabo en micromatrices de ácidos nucleicos mediante los cuales el analito de ácido nucleico diana puede ser una mezcla de secuencias de ácidos nucleicos, que comprende hasta cientos de secuencias de ácidos nucleicos y, en algunos casos, hasta decenas de miles de secuencias de ácidos nucleicos. Este ejemplo se aplica particularmente a análisis de la expresión, en el que se analizan muchas o todas

las secuencias de ARNm que están presentes en un sistema biológico, por ejemplo un tipo de célula determinado a partir de un cultivo celular. Habitualmente, las secuencias de ARNm pueden amplificarse mediante PCR de transcripción inversa con cebadores universales antes de su utilización como analitos en el ensayo. En esta configuración, todas las secuencias de ácidos nucleicos presentes en el analito se aplican simultáneamente a la micromatriz junto con la envoltura o envolturas de sonda apropiados, permitiendo de este modo la interacción de todas las secuencias de ácidos nucleicos del analito con todos los ácidos nucleicos que están presentes en la matriz. En otros casos, el analito de ácido nucleico diana contiene un número limitado de hasta unos cientos de secuencias de ácidos nucleicos y, en algunos casos, sólo una secuencia de ácido nucleico. Generalmente, en el análisis de micromatrices, las señales fluorescentes generadas se convierten en los resultados específicos de secuencias a través de la relación conocida de la localización de un punto en la matriz y la secuencia de la sonda unida al mismo.

Entre las aplicaciones de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se incluyen los sectores de diagnóstico in vitro, entre los que se incluyen el diagnóstico clínico, investigación en los sectores de la biología molecular, detección de drogas de alto rendimiento, diagnóstico veterinario, pruebas agrogenéticas, pruebas medioambientales, análisis de alimentos, monitorización industrial de procesos, análisis forense y análisis periciales. El diagnóstico in vitro y el diagnóstico clínico están relacionados con el análisis de muestras de ácidos nucleicos extraídas del cuerpo para detectar la existencia de un patógeno (por ejemplo, virus, bacterias), una enfermedad o afección, su fase de desarrollo y/o gravedad, y la respuesta del paciente al tratamiento. En el cribado y el desarrollo de fármacos de alto rendimiento se utilizan ácidos nucleicos de manera similar a otros agentes, tales como antígenos, anticuerpos, receptores, etc., para analizar la respuesta de los sistemas biológicos tras la exposición a uno o más compuestos en una disposición de un número elevado de muestras para identificar fármacos precursores ("drug leads"). El diagnóstico veterinario y las pruebas agrogenéticas implican muestras de un animal no-humano o de una especie vegetal similares a las del diagnóstico in vitro y proporcionan procedimientos de control de calidad para productos y procesos agrogenéticos. En las pruebas medioambientales, se pueden analizar los organismos y sus toxinas, que indican la contaminación de un medio ambiente, por ejemplo, suelo, agua, aire, etc. El análisis de los alimentos incluye la cuantificación de organismos, por ejemplo, bacterias, hongos, etc., como un procedimiento de control de calidad. En la monitorización de procesos industriales, se detectan y/o cuantifican ácidos nucleicos, para indicar el control adecuado de un proceso de producción y/o generar una señal si estos procesos están fuera de control. En las pruebas periciales, se identifican los organismos y/o sus toxinas en las pruebas de detección para determinar la categoría de riesgo de un cliente o para ayudar a aprobar a los candidatos. Un experto en la materia reconocerá que las envolturas de sonda y las sondas de la presente invención se pueden utilizar para muchas otras aplicaciones de detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos y nuevas aplicaciones se están desarrollando constantemente.

En una realización, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, incluyendo las envolturas de sonda y las sondas, se pueden utilizar en ensayos para examinar donaciones de plasma y/o la fabricación de plasma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ensayos incluyen pruebas de PCR de donaciones y/o fabricación de plasma para detectar la presencia o ausencia de agentes infecciosos tales como, sin que constituyan limitación, el VIH, VHC, parvovirus, bacterias, levaduras, etc.

En algunas realizaciones, se detectan y/o cuantifican moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm, ARN genómico viral) de una fuente biológica (por ejemplo, sangre, semen, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, piel). Típicamente, las moléculas de ARN, si están presentes, se convierten en moléculas de ADNc y/o se amplifican mediante PCR para proporcionar el analito diana de ácido nucleico que se va a determinar.

En otras realizaciones, los ensayos se llevan a cabo con muestras de ARNm obtenidas a partir de un sistema biológico en diferentes condiciones ambientales, tales como la exposición a concentraciones variables de un fármaco candidato o mezclas de fármacos candidatos, lo que puede proporcionar datos sobre la eficacia, el perfil de seguridad, el mecanismo de acción y otras propiedades de los fármacos candidatos que se requieren en el desarrollo de fármacos.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden utilizar para detectar o cuantificar dianas de ADN (por ejemplo, ADN genómico viral, polimorfismos de ADN) que pueden estar presentes en una muestra.

Los siguientes ejemplos se dan a conocer solamente a modo de ilustración.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1

Determinación de VIH

Se determinó la presencia de ARN de VIH en muestras de plasma utilizando tecnología de PCR en tiempo real (RT-PCR) utilizando protocolos estándar. Se utilizaron muestras de plasma humano normal negativas para el VIH

como controles negativos.

Se sometió al ARN del VIH extraído a partir de plasma a amplificación por PCR en tiempo real por transcriptasa inversa de etapa única, en presencia de una mezcla maestra que comprende tampones, iones  $Mg^{2+}$ , dNTP, DMSO, transcriptasa inversa MMLV, polimerasa Taq, cebadores específicos de VIH y la sonda -1-, con la envoltura de sonda -1- o sin la misma. La reacción de PCR en tiempo real por transcriptasa inversa se llevó a cabo utilizando un AB 7300 (Applied Biosystems, Foster City, California), en condiciones de termociclado según la temperatura de fusión de la sonda/envoltura de sonda. Tras la amplificación por PCR, se analizó la señal fluorescente generada utilizando el software Sistema de Detección de Secuencias (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, California) conocido en la técnica.

Los resultados muestran detección de VIH en muestras de plasma positivas para VIH con valores de  $C_T$  menores de 40. Los controles negativos tuvieron un fondo fluorescente bajo que queda por debajo del umbral establecido en presencia de la envoltura de sonda. En ausencia de la envoltura de sonda, el fondo fluorescente en los controles negativos fue alto, cruzando algunas muestras el umbral fijado en el valor de  $C_T$  menor de 40, lo que produjo resultados falsos positivos.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Grifols Therapeutics Inc.  
Wronska, Danuta  
Schouest, Katherine

<120> Composiciones y procedimientos para la hibridación de ácidos nucleicos

25 <130> T126 2260WO

<150> US 61/526.773  
<151> 2011-08-24

30 <160> 3

<170> PatentIn Versión 3.5

35 <210> 1  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Polinucleótido ("sonda")

<400> 1  
accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 30

45 <210> 2  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Polinucleótido ("envoltura de sonda")

<400> 2  
tcattgatgg tatccattc tg 22

55 <210> 3  
<211> 30  
<212> ADN  
60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3  
atccattct gcagcttct cattgatgt 30

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una composición que comprende:

- 5 a) una envoltura de sonda para la hibridación a una sonda de ácido nucleico en la que la envoltura de sonda comprende un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero; y  
b) una sonda de ácido nucleico para la detección de una secuencia diana en la que la sonda comprende un par FRET, en la que  
10 la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda;

en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo  
15 segmento de sonda;

en el que la temperatura de fusión (Tm) del complejo sonda/diana es mayor que la temperatura de fusión del complejo sonda/envoltura de sonda, para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra.

20 2. Uso, según la reivindicación 1, en el que la secuencia del primer y segundo segmentos de envoltura de sonda son, respectivamente, 100% homólogos a los complementos inversos de las secuencias del primer y segundo segmentos de sonda.

25 3. Uso, según la reivindicación 1, en el que la envoltura de sonda comprende además un espaciador entre el primer y el segundo segmentos de envoltura de sonda.

4. Uso, según la reivindicación 1, en el que el par FRET es un fluoróforo y un desactivador.

30 5. Procedimiento para la determinación de la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) determinar la señal de fluorescencia en un primer nivel a una temperatura de detección cuando una sonda se hibrida a una envoltura de sonda;

35 b) poner en contacto la muestra con la sonda en presencia de la envoltura de sonda, en el que la envoltura de sonda tiene un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero, en el que la sonda es una sonda de ácido nucleico para la detección de un ácido nucleico diana, en la que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es, como mínimo, un 90% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo segmento de sonda, en el que la sonda comprende además un par FRET, en el que el primer y el segundo segmentos de sonda son capaces de hibridar con el primer y el segundo segmentos de envolturas de sondas respectivamente, en ausencia de un ácido nucleico diana para formar un complejo sonda/envoltura de sonda, en el que en presencia del ácido nucleico diana, la sonda es capaz de hibridar preferentemente con el ácido nucleico diana para formar un complejo sonda/complejo diana.  
45

c) determinar el cambio de la señal de fluorescencia de la sonda a la temperatura de detección; en el que el fluoróforo tiene una señal de fluorescencia a un primer nivel cuando la envoltura de la sonda se hibrida con la sonda; en el que la señal de fluorescencia es mayor que la del primer nivel cuando el ácido nucleico diana está presente en la muestra.  
50

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el par FRET es un fluoróforo y un desactivador.

7. Composición que comprende:

- 55 a) una envoltura de sonda para la hibridación a una sonda de ácido nucleico en la que la envoltura de sonda comprende un primer segmento de envoltura de sonda y un segundo segmento de envoltura de sonda que está cadena abajo del primero; y  
b) una sonda de ácido nucleico para la detección de una secuencia diana en la que la sonda comprende un par FRET, en la que la sonda comprende un primer segmento de sonda y un segundo segmento de sonda cadena abajo del primer segmento de sonda;  
60

en el que la secuencia del primer segmento de envoltura de sonda es de 90% a 96% homóloga al complemento inverso de la secuencia del primer segmento de sonda, y en el que la secuencia del segundo segmento de envoltura de sonda es de 90% a 96% homóloga al complemento inverso de la secuencia del segundo segmento de sonda.  
65

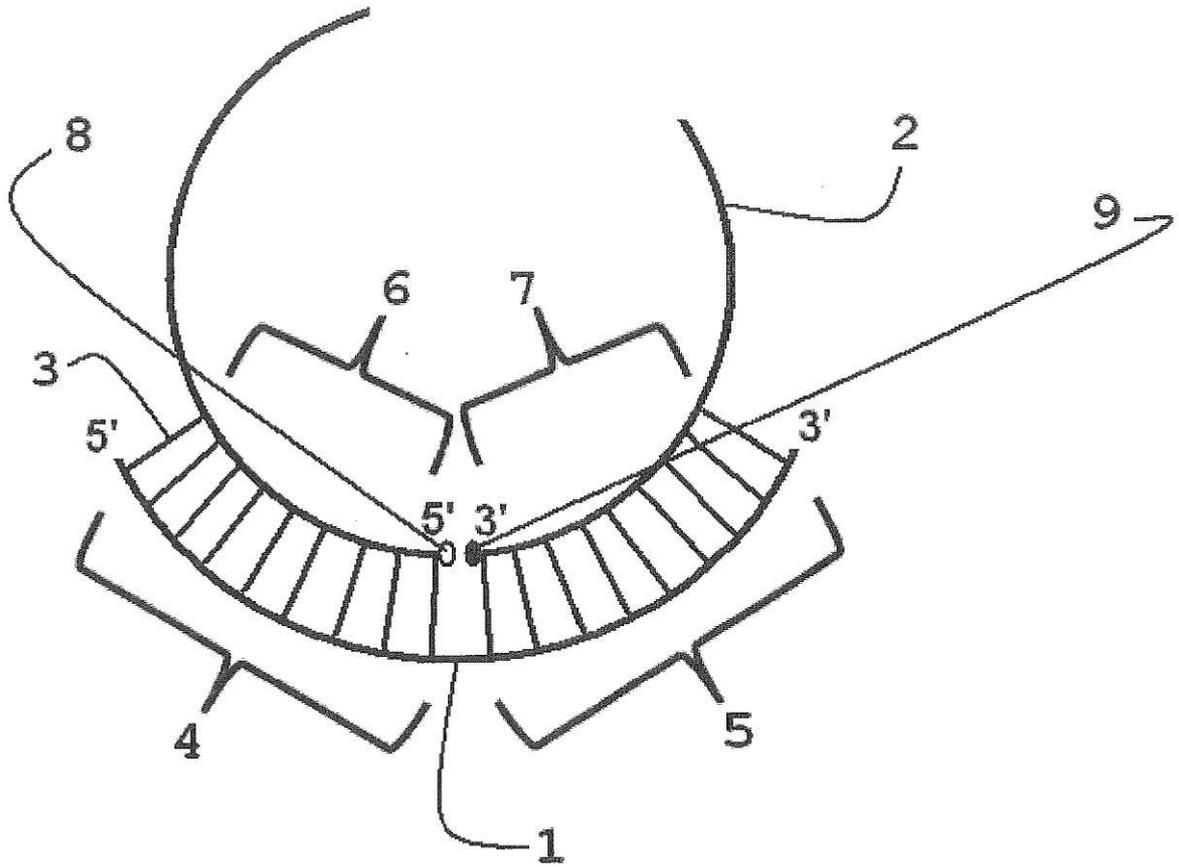


FIG. 1

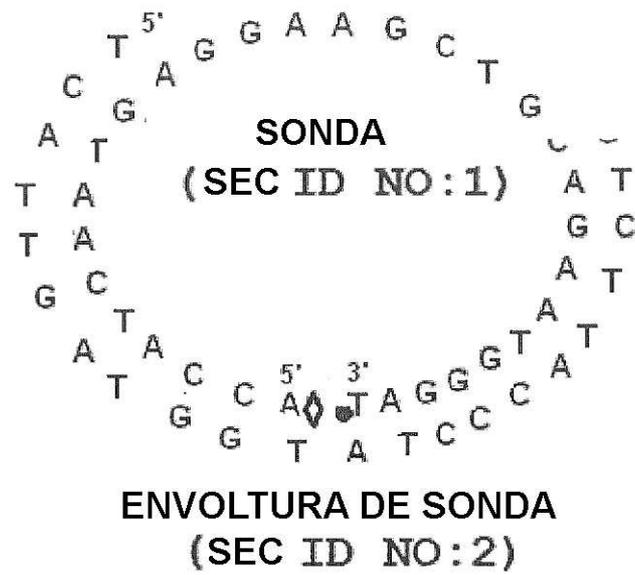
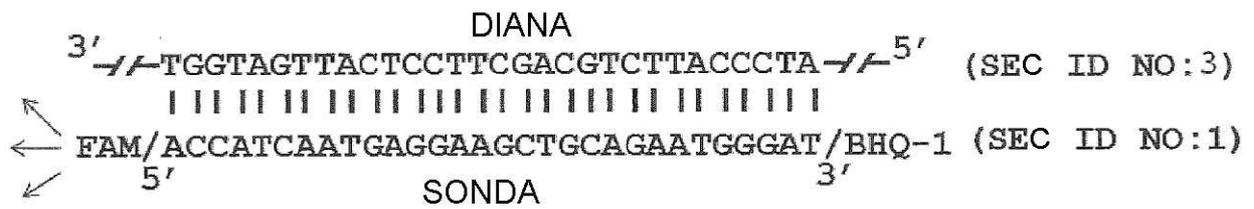


FIG. 2



5'TCATTGATGGTATCCCATTCTG 3' (SEC ID NO:2)  
ENVOLTURA DE SONDA

FIG. 3