

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 606**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2007** **PCT/US2007/067826**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2007** **WO07127992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2007** **E 07761607 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2021488**

54 Título: **Uso de trifosfatos de desoxinucleósidos modificados en sus bases para mejorar la detección de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

28.04.2006 US 795705 P

04.10.2006 US 849526 P

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

18.02.2019

73 Titular/es:

KUTYAVIN, IGOR (100.0%)

18943 203rd N.E.

Woodinville, WA 98077, US

72 Inventor/es:

KUTYAVIN, IGOR

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 700 606 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

Uso de trifosfatos de desoxinucleósidos modificados en sus bases para mejorar la detección de ácidos nucleicos

Campo de la invención

Los aspectos de la invención se refieren en general a nuevos y mejorados procedimientos de detección de ácido nucleico, y más particularmente a nuevos y mejorados procedimientos para la detección de ácidos nucleicos basada en PCR que comprenden el uso de trifosfatos de nucleósidos estabilizados por dúplex, de bases modificadas.

Antecedentes

I. Tecnologías de detección de ADN

Ensayos de detección de ácidos nucleicos y sensibilidad. Las técnicas conocidas de detección de ADN y/o ARN se basan en el principio de complementariedad. Por ejemplo, una secuencia de oligonucleótidos se selecciona basándose en su capacidad para formar un dúplex complementario con una secuencia de ácido nucleico diana deseada o predeterminada, y se detecta el dúplex complementario, indicando la presencia del ácido nucleico dirigido en la mezcla de reacción. Dichos ensayos de detección basados en hibridación deberían, al menos en lo principal, detectar el ácido nucleico de interés independientemente de su concentración en la muestra de ensayo. Sin embargo, la sensibilidad de dichos ensayos directos de detección de la hibridación es limitada, y aunque están en desarrollo actualmente tecnologías altamente sensibles para la detección directa de ácidos nucleicos, la amplificación de los ácidos nucleicos diana es un componente importante de los sistemas de detección de ADN típicos. Se conocen en la técnica numerosas tecnologías de amplificación, los ejemplos más notorios incluyen : *Amplificación de desplazamiento de cadena* (SDA) (Walker G.T. y col, Patente de EE. UU. 5.270.184; Dattagupta N. y col, Patente de EE. UU. 6.214.587; Walker G.T. y col (1996) Nucleic Acids Res., 24, 384-353); *Amplificación en Círculo rotativo* (RCA) (Lizardi P., Patente de EE. UU. 5.854.033); *Multimerización y Amplificación isotérmica de diana lineal* (LIMA) (Hafner G.J. y col (2001) BioTechniques, 30, 852-867); *Amplificación mediada por bucle* (LMA) (Notomi T. y Hase T., Patente de EE. UU. 6.410.278; Notomi T. y col (2000) Nucleic Acids Res., 28, e63); *Amplificación isotérmica utilizando cebadores ARN/ADN compuestos o quiméricos* (Cleuziat P. y Mandrand B., Patente de EE. UU. 5.824.517; Kurn N. (2001) Patente de EE. UU. 6.251.639); *Amplificación de ácidos nucleicos basada en la secuencia* (NASBA) (Oehlschlager F. y col (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 12811-12816; Davey C. y Malek L.T., Patente de EE. UU. 6.063.603); y otros procedimientos. Hasta ahora el elemento más común entre estas tecnologías es el uso de cebadores oligonucleotídicos que forman complejos de hibridación complementarios con secuencias diana deseadas/predeterminadas de los ácidos nucleicos de ensayo, iniciando la síntesis de copias de ADN y proporcionando la amplificación del ácido nucleico diana.

Detección de ácidos nucleicos utilizando reacciones en cadena de polimerasa (PCR); limitaciones en el diseño de cebadores; impedimentos para la detección de ácidos nucleicos. El ADN consiste solo de dos pares de bases, A-T y G-C, y la secuencia y orientación de estos pares de bases en un dúplex de ADN son en lo que se basa sobre todo la diversidad de la vida en todos los niveles genéticos comparativos. En particular, la diferencia de *estabilidad* entre los pares de bases G-C y A-T es un factor importante para definir la función y diversidad del ADN. Sin embargo, dichas diferencias de la estabilidad de dúplex entre las secuencias ricas en A-T y G-C planean un serio problema para la detección de ácidos nucleicos. Sea en forma de una sonda o un cebador, un oligonucleótido de detección útil debe ser capaz de formar un complejo de hibridación complementaria estable con una secuencia de ácido nucleico diana respectiva en condiciones adecuadas para facilitar la amplificación y/o detección. De manera significativa, la identificación de oligonucleótidos de detección adecuados a menudo presenta un desafío o es problemático debido a la diversidad termodinámica de los ácidos nucleicos diana; por ejemplo, la identificación de nucleótidos de detección que tengan una utilidad a temperaturas elevadas características de los procedimientos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) reconocidos en la técnica (por ejemplo, Mullis K.B. y col, Patente de EE. UU. 4.683.195 y Mullis K.B., Patente de EE. UU. 4.683.202) a menudo es problemático, y en algunos casos se descarta, debido a la presencia de composiciones de secuencia A-T y G-C particulares en las secuencias diana (por ejemplo, secuencias ricas en A-T y/o ricas en G-C).

La metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado la detección de ácidos nucleicos, donde al menos en teoría, se puede amplificar y detectar hasta una única copia de ADN o ARN. Un ensayo de detección basado en PCR típico consiste en al menos dos cebadores y una sonda fluorescente. La fluorescencia se puede detectar a nivel nanomolar, que esté bien en el intervalo de sensibilidad y productividad de la PCR. Los cebadores de la PCR se diseñan normalmente para unirse a cadenas de ADN opuestas, es decir, los cebadores se unen en una orientación de manera que la extensión de uno crea una matriz para el otro cebador. La reacción de PCR transcurre en ciclos en los fragmentos de ADN que se sintetizan en el ciclo previo se 'separan sus cadenas' en una etapa de desnaturalización (normalmente a 95 °C), seguido por un enfriamiento rápido para comenzar un estadio de 'hibridación-extensión' (normalmente, que se lleva a cabo a 55-65 °C). En el estadio de hibridación, los cebadores se unen de nuevo a las cadenas amplificadas y se extienden por una ADN polimerasa termófila. En condiciones de PCR normales, la concentración del fragmento de ADN amplificado se duplica en cada ciclo de PCR alcanzando un nivel detectable después de ~ 20-40 ciclos dependiendo de la cantidad/carga de diana inicial.

ADN polimerasa *Thermus aquaticus* ("Taq"; polimerasa Taq) continúa siendo la referencia utilizada más comúnmente utilizada para la extensión de cebadores en la PCR de 'detección' debido a su termoestabilidad en las condiciones de temperaturas elevadas de la etapa/estadio de desnaturalización de la PCR. La polimerasa Taq presenta su máxima actividad a aproximadamente 75 °C, incorporando más de 60 nucleótidos por segundo, (Takagi M. y col., Appl. Environ. Microbiol., 63: 4504-4510, 1997; Innis M.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9436-9440, 1988), definiendo de esta manera una temperatura de extensión óptima para la PCR. En lo principal, llevar a cabo la PCR a dichas temperaturas elevadas (por ejemplo, 75 °C) consigue varias ventajas. Por ejemplo, la extensión a temperaturas elevadas disminuye la diferencia/hueco de temperatura entre las etapas/estadios de desnaturalización (por ejemplo, 95 °C) e hibridación/extensión de 20 °C, ahorra tiempo en la rampa de temperaturas durante el ciclo de PCR, y este ahorro de tiempo puede ser significativo en instrumentos de PCR en tiempo real particulares (por ejemplo, como el ABI 7700 o 7900, y el iCycler™ de Bio-Rad). Adicionalmente, la PCR a temperaturas elevadas es más específica de secuencia, debido a la mala amplificación y la formación de dímeros de cebador aumenta/se acelera a temperaturas reducidas. Sin embargo, a pesar de los beneficios de llevar a cabo la PCR a dichas temperaturas óptimas de Taq, el uso de temperaturas de hibridación por encima de 70 °C es excepcionalmente rara, y por razones prácticas (por ejemplo, estabilidad del dúplex sonda/diana) las temperaturas que se utilizan más comúnmente para la hibridación de cebadores varía desde ~56-58 a 60-62 °C, y más bien, después de la hibridación, una estadio de extensión adicional (>72 °C) se introduce comúnmente para aumentar la eficacia de la etapa/estadio de extensión. Lamentablemente, aunque la elevación de la temperatura para un estadio de extensión adicional (>72 °C) aumenta este aspecto de la reacción de la PCR, incluso una corta exposición de la reacción a una temperatura de extensión baja puede desencadenar una "mala imprimación" y formación de dímeros de cebador. No obstante, los intervalos de hibridación típicos (de ~56-58 a 60-62 °C) persisten en vista de la diversidad estructural y termodinámica del ácido nucleico o el ADN per se; es decir, los dúplex ricos en A/T son significativamente menos estables que los dúplex con un contenido de G/C relativamente elevado, y las condiciones de reacción que utilizan temperaturas de hibridación más elevadas limitarían significativamente el alcance de los procedimientos de la técnica anterior. Por ejemplo, los datos ejemplares que se muestran en la FIGURA 1 ilustran el problema de la eficacia diferencial entre la hibridación y la extensión óptima para Taq.

En la FIGURA 1, el cebador nº 1 (SEQ ID NO: 1) es un oligonucleótido 22-mérico rico en AT que se diseñó aleatoriamente para evitar las repeticiones de mono y dinucleótidos largas, y para tener una relación de bases A/T iguales. Otros cebadores, nº 2-23 (SEQ ID NO: 2-23), se derivaron basándose en la SEQ ID NO: 1, aumentando gradualmente el contenido en GC cambiando T por C y A por G, respectivamente. Como se puede ver, la estabilidad térmica de esos oligonucleótidos 22-méricos ejemplares varía en un amplio intervalo de temperaturas de 43 a 85 °C, dependiendo del contenido en bases GC. Por ejemplo, los cebadores con contenidos GC menores del 35-40 % no cumplen los requisitos de estabilidad para la PCR a 60 °C, aclarando el porqué del intervalo preferido de GC utilizado por todo el software moderno de diseño de cebadores de PCR que está en el intervalo de ~40-80 %. En la práctica, un 22-mero representa una longitud típica para un cebador de PCR, y esta longitud de cebador cumple los requisitos mínimos de T_m . Sin embargo, a menos de que la extensión se extiende a través de una 'isla GC', el aumento de la longitud del cebador para el análisis en secuencias ricas en AT no supera el problema de estabilidad térmica asociado. La FIGURA 2 ilustra la estabilidad térmica de homopolímeros $(dA-dT)_n$ que tienen a alcanzar un valor de 'meseta' ligeramente por encima de los 60 °C, y el aumento de la eficacia de estabilización por base (°C/base) disminuye rápidamente para oligonucleótidos más largos de 25-30-meros. Adicionalmente, los cebadores extremadamente ricos en AT no se pueden utilizar para las PCR a temperaturas >70 °C. Además, los cebadores largos (>30-40-meros) tienen un uso limitado debido a los rendimientos y calidad de fabricación bajos.

Variaciones polimórficas y estudios de expresión genética. Los estudios de expresión genética están entre las aplicaciones de PCR que se asocian menos probablemente con problemas en diseño de sistemas debido a que las secuencias genéticas diana son habitualmente relativamente largas, proporcionando una distancia de secuencia suficiente para el diseño de cebadores y una sonda adecuados. Por el contrario, los diseños de sistemas PCR para la detección de polimorfismos (por ejemplo, SNP) se limitan o se restringen por la localización del polimorfismo diana, y establecen un buen sistema o diseño de detección es normalmente difícil, si no imposible cuando el polimorfismo diana se localiza en una región diana con un contenido de AT que exceda ~65-70 %. Ablando en general, los amplicones de PCR deberían ser lo más cortos posible, debido a que la longitud de los amplicones afecta inversamente en general al rendimiento de la PCR y, en consecuencia, a la actuación general de los ensayos de detección de ácido nucleico.

Instrumentación de PCR. El SMARTCYCLER™ (Cepheid Corporation) es un ejemplo de instrumento fluorescente de tiempo real que puede llevar a cabo ensayos de PCR con perfiles de temperatura y tiempo individualizados para cada celda o compartimento de reacción. Sin embargo, el instrumento solo tiene 16 compartimentos y, aunque es excepcional, en consecuencia, no es particularmente adecuado para los análisis de alto rendimiento. Todos los demás instrumentos disponibles en el mercado proporcionan el uso de condiciones de PCR comunes o uniformes para todas las celdas de reacción en la ejecución de la reacción. Para estos instrumentos, por lo tanto, la selección de una temperatura elevada el régimen de PCR puede excluir la detección de muchas dianas de interés, estrechando el alcance analítico. Por lo tanto, el perfil de requisitos de uniformidad es un factor principal que tiene influencia y/o dicta la elección de la temperatura de ensayo. Adicionalmente, en muchos diseños del sistema FRET (por ejemplo, TaqMan™ y Beacons™), la escala de T_m de la sonda debe ser al menos 5 °C más estable que la de los cebadores para excluir la disminución de la señal fluorescente por debajo de niveles aceptables. Este requisito

contribuye a la motivación para utilizar temperaturas de hibridación más bajas. Por ejemplo, cuando los cebadores se diseñan para llevar a cabo una temperatura de hibridación de 70 °C, la T_m de la sonda debe ser >75 °C, que es un requisito difícil de conseguir.

Aumento de las propiedades de hibridación de sondas y cebadores. Se conocen en la técnica varias técnicas para aumentar las propiedades de hibridación de la sonda y el cebador. Por ejemplo, la conjugación con un 'resto de unión al agrupamiento principal' (resto MGB; Kutyavin I.V. y col., Nucleic Acids Res., 25: 3718-3723, 1997) es un agente de estabilización del dúplex robusto que tiene una tecnología TaqMan™ revitalizada (Kutyavin I.V. y col., Nucleic Acids Res., 28: 655-661, 2000). Al igual, en el caso de las sondas Eclipse con cola MGB (Afonina I.A. y col., BioTechniques, 32: 940-949, 2002), haciendo posible una reducción sustancial en la longitud de la sonda inesperadamente dando como resultado, fondos de fluorescencia menores. Por ejemplo, se demostró que las sondas TaqMan™-MGB 12-18méricas relativamente cortas proporcionan una discriminación de SNP mejorada (Kutyavin I.V. y col., Nucleic Acids Res., 28:655-661, 2000),, y la provisión de niveles de señal relativamente buenos y la fabricación directa contribuye al éxito comercial y la aceptación amplia de dichas sondas. Adicionalmente, los derivados de ácido nucleico bloqueado™ (LNA™) son modificaciones satisfactorias utilizadas en el diseño de sondas FRET (Goldenberg, O. y col., Biotechniques, 38: 29-32, 2005; You, Y. y col., Nucleic Acids Res., 34: e60, 2006), así como los derivados de ácidos nucleicos proteicos ("PNA") (Ortiz, E. y col., Mol. Cell. Probes, 12, 219-226, 1998). Lamentablemente, sin embargo, la ADN polimerasa (por ejemplo, Taq) no tolera muchas, si no la mayoría de las modificaciones estructurales aplicables potencialmente en el diseño de sondas. Por ejemplo, aunque los análogos de nucleótido LNA se pueden incorporar en los cebadores oligonucleótidos, el número de esas modificaciones está limitado. Ejemplos del uso de cebadores modificados LNA se describen en Latorra D. y col. Mol. Cell. Probes, 17: 253-259, 2003; Latorra D. y col., Hum. Mutat., 22:79-85, 2003; Di Giusto D.A. y King G.C., Nucleic Acids Res., 32: e32, 2004.

Por lo tanto, existe una necesidad pronunciada en la técnica para estrategias versátiles y simples para mejorar la amplificación por PCR y la detección de secuencias de ácido nucleico composicionalmente anormales o extremas, y en particular en el contexto de secuencias diana ricas en AT.

II. Síntesis enzimática de ácidos nucleicos utilizando análogos modificados de 5'-trifosfatos de nucleósidos

Independientemente del progreso significativo hecho hasta la fecha en la detección de ácidos nucleicos, los procedimientos para el aumento de las propiedades de hibridación de los cebadores y sondas siguen sin ser los óptimos.

Cebadores con bases modificadas. La fabricación de oligonucleótidos que tienen restos de estabilización del dúplex y análogos de nucleótidos es limitada, compleja y cara. Por ejemplo, Lebedev Y. y colaboradores (Genet. Anal., 13: 15-21, 1996) han demostrado los beneficios de la utilización de cebadores de PCR y sondas que contienen bases modificadas tales como la 5-metil citosina (5-MeC) y 2,6-diamino-purina (2-amA) en lugar de citosina y adenina, respectivamente (Prosnjak M.I. y col., Genomics, 21: 490-494, 1994). Estos oligonucleótidos tienen una mayor afinidad de lo normal para las secuencias complementarias y pueden llevar a cabo la amplificación mejor que sus equivalentes normales en la PCR. Significativamente, el uso de dichos cebadores y sondas permite la amplificación a temperaturas de hibridación como mucho a 72 °C (Lebedev Y. y col., Genet. Anal., 13:15-21, 1996). Lamentablemente, estos cebadores con bases modificadas no se han adoptado en la técnica, más probablemente debido al coste relativamente alto de fabricación.

Uso de los 5'-trifosfatos de nucleósidos con bases modificadas en la extensión de cebadores y la PCR. Se ha informado del uso de 5'-trifosfatos modificados en la preparación de polímeros de ADN y ARN para aplicaciones en bioingeniería, nanotecnología, biología molecular y medicina. La síntesis química de polinucleótidos es ineficaz y difícil, y no se pueden introducir químicamente ciertas modificaciones estructurales debido a su relativa inestabilidad. La síntesis enzimática es una estrategia alternativa para preparar los biopolímeros deseados, y se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar el ámbito de las modificaciones de nucleótidos que soportan la síntesis enzimática.

Los polinucleótidos modificados se han utilizado en: secuenciación de ácidos nucleicos (Ward B. y col (2005) Patente de EE. UU. 6.902.914; Porter K.W. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25:1611-1617); y el desarrollo de técnicas de inmovilización y marcado, y los estudios de interacciones de ácido nucleico con proteínas (Seela F. y Röling A. (1992) Nucleic Acids Res., 20: 55-61; Bailly C. y Waring M.J. (1995) Nucleic Acids Res., 23: 885-892; Bailly C. y col (1998) Biochemistry, 37: 1033-1045; Bailly C. y Waring M.J. (1998) Nucleic Acids Res., 26: 4309-4314). Adicionalmente, se han utilizado ciertas modificaciones de nucleótidos en: aumento del repertorio catalítico de ácidos nucleicos (Jäger S. y Famulok M. (2004) Angew. Chem. Int. Ed., 43: 3337-3340; Lee S.E. y col (2001) Nucleic Acids Res., 29: 1565-1573; Held H.A. y Benner S.A (2002) Nucleic Acids Res., 30: 3857-3869; Kuwahara M. y col (2003) Nucleic Acids Res. Suppl., 3: 37-38); protección de polinucleótidos de exo y endonucleasas (Ward B. y col (2005) Patente de EE. UU. 6,902,914; Summers J.S. y Shaw B.R. (2001) Current Medicinal Chemistry, 8: 1147-1155; Shaw B.R. y col (2004) Patente de EE. UU. 6,808,897; Porter K.W. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25: 1611-1617; Seela F. y Röling A. (1992) Nucleic Acids Res., 20: 55-61); y proporcionando polímeros de dúplex de ADN para estudiar las endonucleasas dependientes de metilo (Wong K.K. y McClelland, M. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 1081-1085).

Sin embargo, los ejemplos de la utilización de derivados modificados de dNTP para preparar polinucleótidos con propiedades de hibridación aumentada son excepcionalmente raros. Específicamente, los estudios publicados se refieren a síntesis enzimática de ARN de cadena sencilla marcado de manera fluorescente para la detección y caracterización por hibridación en micromatriz, cuando se utilizaron análogos 5'-trifosfatos de ribonucleósido (rNTP) con bases modificadas en la polimerización de ARN con el intento de mejorar las señales de hibridación a través de un amplio intervalo de secuencias y niveles de expresión. Por ejemplo, Nguyen A. y col (BMC Biotechnology, 2:14, 2002) utilizaban 5'-fosfatos de ribonucleósidos estabilizadores del dúplex (rNTP) tal como 5'-Trifosfatos de 2,6-diaminopurina r(2-amA)TP, 5-metil uridina r(5-MeU)TP y 5-metil citosina r(5-MeC)TP, mientras que Hacia J.G. y colaboradores (Nucleic Acids Res., 26:4975-4982, 1998) estudiaron análogos de r(2-amA)TP, r(5-MeU)TP y 5-(1-propinil)-uridina r(5-PrU)TP. Nguyen y col, descubrieron que las muestras de ARN que contenían 2,6-diamino-purina aumentaban la intensidad de la señal en la mayoría de las secuencias mientras que otras dos modificaciones estabilizantes del dúplex utilizadas que se utilizaban r(5-MeU)TP y r(5-MeC)TP, daban lugar a una disminución de la señal. Por el contrario, Hacia y col., informaron de resultados positivos en ARN diana que contenían 5-metiluridina que presentaban aumentos localizados en la señal de hibridación mientras que se mantiene las especificidades de hibridación de falta de coincidencia de un único nucleótido comparables a las de los ARN diana no modificados. Por otra parte, observaron una reducción de intensidades de señal de hibridación para ARN dianas que contienen r(2-amA). Por lo tanto, estos resultados de que se informa son inconsistentes y no concluyentes y no clarifican la técnica con respecto a cualquier aplicabilidad general o adicional del uso de análogos de 5'-trifosfatos de ribonucleósidos (rNTP) con bases modificadas.

Las nucleósido polimerasas han demostrado ser especialmente sensibles a las modificaciones del resto de azúcar en los nucleótidos (Kempeneers V. y col (2005) Nucleic Acids Res., 33:3828-3836). Ciertas modificaciones en el azúcar de dNTP inhiben las ADN polimerasas víricas que hacen a estos compuestos interesantes para la química medicinal como fármacos candidatos (Matthes E. y col (1991) Antimicrob. Agents Chemother., 35:1254-1257; Reid R. y col (1988) J. Biol. Chem., 263:3898-3904). Los 2'-desoxirribonucleósidos modificados con 2'-flúor son ejemplos adicionales de modificación de azúcar en los dNTP, pero el uso de estos derivados en la polimerización es limitado (Ono T. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25:4581-4588). Ono, T. y col., identificaron solo cuatro ADN polimerasas (Pfu(exo-), Vent(exo-), Deep Vent(exo-) y UITma que eran capaces de incorporar derivados de 2'-fluoro dNTP con una eficacia razonable. Se pueden tolerar modificaciones relativamente menores en el resto α -fosfato de los dNTP por las ADN polimerasas (Dobrikov M.I. y col (2003) Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22:1651-1655), siendo los ejemplos más reconocidos los derivados tio (Ward B. y col (2005) Patente de EE. UU. 6.902.914) y borano-fosfato (Summers J.S. y Shaw B.R. (2001) Current Medicinal Chemistry, 8:1147-1155; Shaw B.R. y col (2004) Patente de EE. UU. 6.808.897). Las propiedades de sustrato de estos dNTP modificados son comparables con los de los nucleótidos naturales y esto hace posible su aplicación en la secuenciación basada en PCR (Ward B. y col (2005) Patente de EE. UU. 6.902.914; Porter K.W. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25: 1611-1617). Sin embargo, estas modificaciones tienen un efecto negativo sobre las propiedades de hibridación de ADN (Wang J.X. y col (2005) Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 24: 951-955) y esto hace que estos dNTP modificados con borano sean inútiles eficazmente en la práctica de la detección de PCR.

Irónicamente, los derivados de dNTP que dan lugar a la desestabilización del dúplex tienen la máxima aplicabilidad en la PCR. Seela & Röling (Nucleic Acids Res., 20:55-61. 1992) investigaron las propiedades de sustrato de análogos de 7-deaza purina de dNTP y descubrieron que la 7-deaza desoxirriboguanisina 5'-trifosfato (c^7I_dTP) necesitaba la presencia del dNTP parental. también se demostró que estos son modificaciones desestabilizantes de dúplex. Goullain T. y col., (Nucleic Acids Res., 29: 1898-1905, 2001) demostraron que las propiedades del sustrato del c^7I_dTP se pueden mejorar mediante la incorporación de cadenas laterales colgantes de aminopropilo, Z-aminopropenilo y aminopropinilo en la posición C7 del sistema heterocíclico, sin embargo, las mediciones precisas del rendimiento de PCR no se hicieron y la utilidad y aplicabilidad de esos derivados para la detección por PCR no se ha establecido. La sustitución de la posición N7 en las purinas por un átomo de carbono reduce la estabilidad del dúplex y esta propiedad puede utilizarse eficazmente, por ejemplo, en la resolución de los problemas notorios de secuencias ricas en poli-G. Por ejemplo, utilizaron c^7I_dTP y análogos de c^7I_dTP para evitar la pausa enzimática prematura durante la secuenciación de matrices de PCR. Dichos efectos desestabilizantes son especialmente profundos para la desoxinosina, y el análogo respectivo de dITP se utilizó satisfactoriamente para la amplificación por RT-PCR de los ARNm en presencia de ADN genómico (Auer T. y col (1996) Nucleic Acids Res., 24:5021-5026). Sin embargo, los datos publicados indican que la aplicación de dITP en la PCR está extremadamente limitada a estos trifosfatos de nucleósidos con bases modificadas que no se pueden utilizar como sustitución completa de dGTP natural.

El trifosfato de desoxiuridina (dUTP) es otro ejemplo más de un dNTP desestabilizante del dúplex que se utiliza comúnmente en la PCR. Esto se aplica habitualmente como una sustitución del 5'-trifosfato de timidina. Los ADN que contienen nucleósidos dU se pueden escindir selectivamente en presencia de un uracilo glicosilasa (Dempfle B. y col (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7731-7735; Wilson III D.M. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25:933-939; Strauss P.R. y col (1997) J. Biol. Chem., 272:1302-1307) y el tratamiento de las muestras antes de las reacciones de PCR ayuda a la prevención de la contaminación que se mantiene de muestra a muestra (Gelfand D.H. y col (1995) Patente de EE. UU. 5.418.149).

Las pirimidinas sustituidas en la posición 5 se toleran razonablemente por las ADN polimerasas haciendo que los respectivos análogos de dNTP sean prometedores para su uso en la PCR. Los restos de modificación pueden ser

tan grandes como el ácido 4-acético imidazol y urocánico acoplado mediante un enlace 3-amino-propinil y E-3-aminopropenilo (Lee S.E. y col (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:1565-1573). Al contrario que estos engarces rígidos, los alquilo flexibles afectan negativamente las propiedades de sustrato del dNTP. Held, H.A. y col., (*Nucleic Acids Res.*, 30:3857-3869, 2002) examinaron ocho polimerasas diferentes en cuanto a su capacidad para incorporar derivados 2'-desoxiuridina modificada en 5 que llevan un grupo tiol protegido unido mediante engarces tipo alquilo que contienen tres o cuatro átomos de carbono. Las polimerasas reaccionaban diferencialmente con la dUTP con bases modificadas en la PCR. Aunque no se proporcionaban datos precisos sobre el rendimiento de la PCR, los autores reivindicaban que se observaban productos de PCR en muchos casos. Se obtuvieron resultados similares por Kuwahara, M. y col., (*Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3:37-38, 2003), que estudiaron los análogos modificados de trifosfatos de 2'-desoxicitidina, que tienen engarces (6-aminoexil) carbamoilmetil o 7-amino-2,5-dioxaheptil en la posición C5. Se descubrió que ambos análogos eran buenos sustratos para el Vent(exo-)ADN polimerasa en la PCR, dando como resultado ADN modificados de longitud completa.

No está claro actualmente si existe una contribución termodinámica positiva o negativa sobre la formación de dúplex en los estudios publicados utilizando dNTP particulares con pares de bases modificados (Lee S.E. y col (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:1565-1573; Held H.A. y Benner S.A (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30:3857-3869; Kuwahara M. y col (2003) *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3:37-38; Goullain T. y col (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:1898-1905; Jäger S. y Famulok M. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:3337-3340). Además, en los casos en los que el efecto estabilizante del dúplex de la modificación de bases se ha indicado, por ejemplo, en el caso de la 5-metil-citosina (Szer W. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20:182-186; Ono A. y Ueda T. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15:219-232; Butkus V. y col (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15:8467-8478; Szer W. y Shugar D. (1966) *J. Mol. Biol.*, 17:174-187; y Uesugi S. y col (1986) *Chem. Pharm. Bull.*, 34:51-60), se informó de complicaciones en la PCR que no proporcionaban un producto de amplificación en algunos casos (véase, Wong K.K. y McClelland, M. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19:1081-1085).

La 2,6-diaminopurina es otro análogo de base con un profundo efecto estabilizante de dúplex (Howard F.B. y col (1966) *J. Biol. Chem.*, 241:4293-4295; Howard F.B. y col (1976) *Biochemistry*, 15:3783-3795; Howard F.B. y Miles H.T. (1984) *Biochemistry*, 23:6723-6732; Scheit K.H. y Rackwitz H.-R. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10:4059-4069; Gaffney B.L. y col (1984) *Tetrahedron*, 40:3-13). De acuerdo con Kuwahara M. y col., (*Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3:37-38, 2003), sin embargo, el uso del análogo d(2-amA)TP respectivo en la PCR está restringido a amplicones relativamente cortos. Bailly, C. y col. Describieron una síntesis asistida por PCR de un fragmento de ADN de doble cadena de 160 pb de longitud relativa utilizando trifosfatos de desoxinucleósido 2,6-diaminopurina como sustitución completa del dATP (Bailly C. y Waring M.J. (1995) *Nucleic Acids Res.*, 23:885-892; Bailly C. y col (1998) *Biochemistry*, 37:1033-1045; Bailly C. y Waring M.J. (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26:4309-4314), pero los autores informaron que utilizando condiciones de PCR significativamente anormales (temperatura y tiempo de hibridación) reflejaban los límites de la utilidad de la d(2-amA)TP en la PCR. Lamentablemente, todos los estudios citados anteriormente no incluían comparaciones precisas de los dNTP modificados con las propiedades de sustrato de los respectivos 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos naturales, de manera que la utilidad práctica de estos análogos para la detección de PCR sigue siendo ambigua e incierta en la técnica.

En resumen, por lo tanto, las estrategias tradicionales para la estabilización de dúplex que se concentran en la modificación de cebador y sonda no son práctica, y la utilidad de la incorporación de análogos de bases durante la amplificación en la detección por PCR sigue siendo ambigua e incierta en la técnica.

Hay, por lo tanto, y a pesar de algunos progresos en el uso de nucleótidos modificados, una necesidad pronunciada en la técnica de estrategias versátiles, simples y baratas para estabilizar complejos complementarios de oligonucleótidos a la vez que se proporciona una amplificación robusta y rápida y la detección de ácidos nucleicos diana. Existe una profunda necesidad en la técnica de una estrategia versátil y simple para mejorar la amplificación por PCR y la detección de anomalías composicionales o secuencias de ácidos nucleicos extremas, y en particular en el contexto de secuencias dianas ricas en A-T.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra, de acuerdo con aspectos ejemplares de la presente invención, un diagrama de barras que muestra la dependencia entre las temperaturas de fusión y el contenido de bases G/C de los cebadores 22-méricos de PCR (SEQ ID NO: 1-23) Las secuencias de los cebadores se muestran a la derecha. Los cálculos de T_m se basaron en las condiciones que corresponden a 40 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) con 200 nM de cebador y 200 nM de complemento. Se prefieren los cebadores entre las líneas verticales para los diseños de ensayo PCR. Los cebadores con un contenido de G/C <40 % tienen valores de T_m demasiado bajos para formar híbridos estables en condiciones rigurosas de PCR (por ejemplo, 60 °C), mientras que los cebadores con un contenido en G/C >80 % puede sobre estabilizar el amplicón si el resto del amplicón tiene un alto contenido en G/C.

La Figura 2 muestra, de acuerdo con aspectos ejemplares de la presente invención, la dependencia de la estabilidad de un dúplex homopolímero (dA·dT)_n graficado frente a la longitud del dúplex. Las temperaturas de fusión se calcularon utilizando la estrategia y condiciones que se describen en la Figura 1.

La Figura 3 muestra estructuras de 5'-trifosfatos de 2'-desoxinucleósidos con bases modificadas que se utilizan en aspectos ejemplares de la presente invención. "B" se refiere a bases modificadas, y "X" e "Y" son los restos de

sustitución que están en la posición 5.

La Figura 4 muestra las secuencias de un oligodesoxirribonucleótido 96-mérico diana (SEQ ID NO: 24), cebadores de PCR directo (SEQ ID NO: 25) e inverso (SEQ ID NO: 26) y una sonda 22-mérica fluorescente (SEQ ID NO: 27) que se utilizan en los ensayos TaqMan® en aspectos ejemplares de la presente invención. Los ensayos Scorpion se llevaron a cabo utilizando el cebador inverso (SEQ ID NO: 26) y el cebador Scorpion (SEQ ID NO: 28) una sonda FRET que forma una horquilla (las secuencias del extremo complementarias están subrayadas) está conectada al extremo 5' del cebador directo mediante un engarce C18 largo y flexible (Glen Research). Los cebadores y la sonda utilizada se fabricaron a partir de nucleósidos completamente naturales, o de manera alternativa con bases modificadas incorporadas. Cuando se utilizaban oligonucleótidos con bases modificadas, las posiciones que se muestran en negrita se sustituyeron con 2,6-amino-purina o 5-metil citosina respectivamente. En la SEQ ID NO: 24 se subraya el sitio de unión del cebador inverso (que se muestra en orientación inversa 3'→5'). "FAM" se refiere a 6-fluoresceína y "Q" se refiere a BLACK HOLE QUENCHER™ (BHQ1) de Biosearch Technologies.

Las Figuras 5A-5D muestra los resultados ejemplares del control por fluorescencia que se obtiene por los ensayos de detección TaqMan® durante la PCR en tiempo real en un SmartCycler™ (Cepheid). Se utilizaron las estructuras del oligonucleótido diana (SEQ ID NO: 24), cebadores de PCR directo (SEQ ID NO: 25) e inverso (SEQ ID NO: 26) y sonda TaqMan® como en la Figura 2. Las concentraciones finales de los componentes en las mezclas de reacción (25 µl) al inicio de la PCR eran: cebadores de PCR directo e inverso – 200 nM; sonda TaqMan® – 200 nM; oligonucleótido diana – 10.000 copias por reacción; dNTP – 200 mM de cada uno; JUMP START™ ADN polimerasa (Sigma) – 0,04 U/ml en 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Se restó la fluorescencia de fondo. El perfil de ciclado de PCR (95 ° 2') → (95 ° 10" → X ° 45")₅₅ se utilizó con una temperatura de hibridación "X" que varía de 65 a 75 °C.

La Figura 5A muestra un conjunto ejemplar de experimentos en los que se emplearon los cebadores modificados y la sonda TaqMan® con dNTP todos naturales.

La Figura 5B muestra los resultados de experimentos ejemplares que son análogos de los de la Figura 5A, pero en los que se sustituyeron completamente el 5'-trifosfato de 2'-desoxirriboadenosina (dATP) natural por el 5'-trifosfato del nucleósido 2'-desoxirribo-2,6-diaminopurina (d(2-amA)TP).

En la Figura 5C, se utilizaron cebadores y sondas con base modificadas en el conjunto de experimentos ejemplares, pero en el que todos los nucleósidos trifosfatos (dNTP) eran naturales.

La Figura 5D representa los ensayos TaqMan® en tiempo real en los que se combinaron las modificaciones de sistema de la Figura 5B y Figura 5C y se emplearon al mismo tiempo; es decir, se utilizaron los cebadores y la sonda con bases modificadas con una sustitución de dATP completa con d(2-amA)TP.

Las Figuras 6A-6D muestran los resultados de los ensayos TaqMan® en tiempo real en los que uno de los dNTP (que se utilizan en la Figura 6A) se sustituía completamente con: 5'-trifosfato de 5-bromo-2'-desoxirribouridina (d(5-BrU)TP, Figura 6B); 5'-trifosfato de 5-propinil-2'-desoxirribouridina (d(5-PrU)TP, Figura 6C) y 5'-trifosfato de 5-metil-2'-desoxirribo-citidina (d(5-MeC)TP, Figura 6D), respectivamente. La Figura 6A es idéntica a la Figura 5A, y se muestra aquí para facilitar la comparación directa. Los cebadores y sonda TaqMan® de la PCR estaban sin modificar. Otras composiciones de reacción de PCR, concentraciones de componentes y perfiles de temperatura/tiempo eran las mismas que se describen en los experimentos ejemplares que se muestran en la Figura 3.

Las Figuras 7A-7D muestran los resultados del control de la fluorescencia en tiempo real en ensayos TaqMan® ejemplares con temperaturas de hibridación variables (que se muestran en °C para cada curva). La Figura 7B muestra las curvas de fluorescencia en la reacción de PCR cuando se sustituyen dos dNTP naturales (dATP y dTTP) con sus respectivos análogos d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP. Los resultados de la Figura 7A son idénticos a los que se muestran en la Figura 5A. Los cebadores y la sonda TaqMan® de la PCR no se modificaban. Otras composiciones de la reacción de PCR, concentraciones de componentes y perfiles de temperatura/tiempo eran los mismos que se describen en los experimentos ejemplares de la Figura 5. Los diagramas de los paneles de las Figuras 7C y 7D que se muestran debajo de las Figuras 7A y 7B, respectivamente, son los mismos resultados que se muestran en las Figuras 7A y 7B, pero se representan en escala logarítmica. Los umbrales de curva fluorescente ("C_t") se muestran con flechas y se determinaron como número de ciclos en los que las curvas logarítmicas apuntan (i), o interceptan (ii) el eje X.

Las Figuras 8A y 8B muestran curvas de fluorescencia en tiempo real. La Figura 8A muestra las curvas de fluorescencia en tiempo real combinadas que se obtienen por el mismo ensayo TaqMan® y composición de reacción que se utilizó en los experimentos de la Figura 7B, sin embargo, el perfil de PCR era diferente; a saber, (95 ° 2') → (9X ° YY" → 67 ° 45")₅₅. En este caso, la temperatura de hibridación era constante (67 °C), y las condiciones de desnaturalización variaban de temperatura (X = 95-97 °C) y tiempo (YY = 10 o 15 segundos) como se indica en cada curva. Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan® no se modificaron. Otras composiciones de reacción de PCR y concentraciones de componentes eran las mismas que las descritas en la Figura 5. La Figura 8B (a la derecha) muestra los mismos experimentos que en la Figura 8A, pero la fluorescencia se grafica en escala logarítmica. Los umbrales de la curva de fluorescencia ("C_t") se muestran mediante flechas para las curvas de 95 ° 10" y 97 ° 15".

La Figura 9 muestra la actuación de la señal de los ensayos TaqMan® que se muestran en las Figuras 5, 6 y 7 ejemplares frente a la temperatura de hibridación de PCR. La fluorescencia de cada reacción individual en el ciclo 50 de PCR se grafica frente a la temperatura de hibridación utilizada en esa reacción. En los casos en los que se sustituyeron dos dNTP naturales con d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP, los datos de fluorescencia se tomaron en el ciclo 54 debido al "retraso" de 4 ciclos en el valor de C_t observado en ese ensayo (Figura 7). Las flechas

apuntan a las temperaturas de hibridación a las que se alcanzaba aproximadamente la mitad de la señal de ensayo (300 unidades de fluorescencia).

Las Figuras 10A-10C muestran los resultados de control de la fluorescencia que se obtienen con los ensayos de detección con Scorpion. Las estructuras del oligonucleótido diana, los cebadores de PCR directo y Scorpion que se utilizaron son los que se muestran en la Figura 4. Las concentraciones finales de los componentes de las mezclas de reacción (25 ml) al inicio de la PCR: cebadores de PCR directo y Scorpion – 200 nM; oligonucleótido diana - 10.000 copias por reacción; dNTP – 200 mM de cada; ADN polimerasa JUMP START (Sigma) – 0,04 U/ml en 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Se restó la fluorescencia de fondo. Se utilizó un perfil de PCR (95 ° 2') → (95 ° 10" → X ° 45")₅₅ con la temperatura X que variaba de 61 a 75 °C. La Figura 10A muestra un conjunto de experimentos ejemplares en los que se empleaba el sistema de detección Scorpion con todos los dNTP naturales. La Figura 10B muestra los resultados experimentales que eran análogos a la Figura 10A, pero el dATP natural se sustituyó completamente con un análogo con bases modificadas d(2-amA)TP. La Figura 10C muestra un conjunto de experimentos que también son análogos a la Figura 10A, pero en este caso dos dNTP naturales, en particular dATP y dTTP se sustituyeron completamente con los análogos con bases modificadas respectivos d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP. Para asegurar la estabilidad de los valores de C_t, se utilizó un perfil de PCR ligeramente diferente (95 ° 2') → (97 ° 15" → X ° 45")₅₅ en el conjunto de experimentos de la Figura 10C.

La Figura 11 muestra la actuación de la señal de los ensayos Scorpion de las Figuras 10 frente a la temperatura de hibridación de PCR. La fluorescencia de cada reacción individual en el ciclo 50 de la PCR se graficó contra la temperatura de hibridación utilizada en esa reacción. Las flechas apuntan las temperaturas de hibridación a las que se alcanzaba aproximadamente la mitad de la señal del ensayo (150 unidades de fluorescencia).

Sumario de aspectos de la invención

Unos aspectos de la invención proporcionan nuevos procedimientos para la detección de ácidos nucleicos que comprenden la amplificación de ácidos nucleicos utilizando 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos con las bases modificadas (dNTP) como se define en las reivindicaciones 1-15 para proporcionar productos de amplificación más estables.

Unos aspectos particulares proporcionan un procedimiento para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende: las reacciones de amplificación y detección, en las que las propiedades de hibridación de los componentes de oligonucleótido utilizados en dicha reacción de amplificación y/o de detección se mejoran amplificando un ADN modificado con mejores propiedades de hibridación en una mezcla de reacción que comprende ADN polimerasa y al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas.

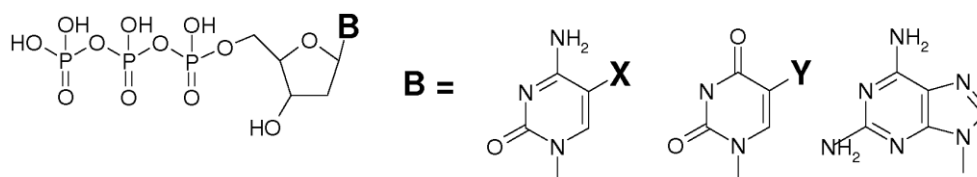
Unos aspectos adicionales proporcionan un procedimiento para la detección de un ácido nucleico en una muestra, que comprende: proporcionar una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico, al menos un oligonucleótido cebador, una ADN polimerasa, y una mezcla de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos que contengan al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas; amplificar el ácido nucleico diana, en el que al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas se incorpora en los amplicones proporcionando copias de un ADN modificado con mejores propiedades de hibridación, y en el que dicho ADN modificado sirve como matriz para el al menos un oligonucleótido cebador en cualquier estadio de la amplificación; y detectar el ADN modificado, en el que la presencia del ADN modificado es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en dicha muestra.

Unos aspectos adicionales proporcionan un procedimiento para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: proporcionar una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico diana, al menos un oligonucleótido cebador, una ADN polimerasa, y una mezcla de 5'-trifosfato de desoxinucleósidos que contienen al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas; amplificar el ácido nucleico diana en el que el al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas se incorpora en los amplicones proporcionando copias de un ADN modificado con mejores propiedades de hibridación; proporcionar al menos un oligonucleótido sonda; hibridar el al menos un oligonucleótido sonda al ADN modificado para formar un complejo; y detectar el complejo en el que la presencia del complejo es indicativa de la presencia del ácido nucleico en la muestra.

Unos aspectos adicionales más proporcionan un procedimiento para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: amplificar el ácido nucleico diana utilizando una PCR de detección en una mezcla de reacción que comprende: un ácido nucleico diana, al menos dos oligonucleótidos cebadores suficientes para proporcionar una amplificación exponencial del ácido nucleico diana, una ADN polimerasa, y una mezcla de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos que contienen al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas, en el que al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas se incorpora en los amplicones proporcionando copias de un ADN modificado con mejores propiedades de hibridación; y detectar dicho ADN modificado utilizando al menos un oligonucleótido sonda que se hibrida con dicho ADN modificado para formar un complejo, y detectar el complejo, en el que la presencia del complejo es indicativa de la presencia del ácido nucleico en la muestra.

En unos aspectos particulares de las distintas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ADN. En otros aspectos, el ácido nucleico diana es un ARN. En ciertos aspectos, el ácido nucleico diana es un ARN y la amplificación del

ácido nucleico diana incluye un estadio en el que al menos se sintetiza una copia de ADN de dicho ARN utilizando una transcriptasa inversa. En algunos aspectos, se utilizan más de un oligonucleótido cebador para amplificar el ácido nucleico diana, y en el que el ADN modificado sirve como matriz para al menos uno de dichos oligonucleótidos cebadores en cualquier estadio de la amplificación. En aspectos adicionales, se amplifican y detectan más de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, se proporciona al menos un oligonucleótido cebador para cada ácido nucleico diana amplificado y detectado. En realizaciones particulares, se proporciona más de uno de los oligonucleótidos diana para cada dicho ácido nucleico diana amplificado y detectado y en el que al menos uno de los ADN modificados sirve como matriz para al menos uno de dichos oligonucleótidos cebadores en cualquier estadio de amplificación. En ciertos aspectos, la detección del ácido nucleico diana se lleva a cabo después de la amplificación. En otros aspectos, la detección del ácido nucleico diana se lleva a cabo en tiempo real. En ciertas realizaciones los dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas reemplaza completamente el dNTP natural respectivo. En otras realizaciones el dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas representa una fracción del dNTP natural respectivo. En ciertos aspectos, la mezcla de reacción comprende más de un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas, en cada caso sea reemplazando o representando una fracción del dNTP natural respectivo. En ciertos aspectos, el dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas tiene la Fórmula I:



En ciertas realizaciones, la amplificación y detección del ácido nucleico diana se lleva a cabo para medir la cantidad de dicho ácido nucleico diana en dicha muestra. En implementaciones particulares, la amplificación del ácido nucleico diana comprende el uso de una amplificación isotérmica. En otros aspectos, la amplificación del ácido nucleico diana comprende el uso de una PCR de detección. En ciertas realizaciones, al menos uno de los oligonucleótidos cebadores, oligonucleótidos sonda, y/o ADN modificados contienen un marcador y en el que este marcador consigue la detección del ADN modificado. En ciertos aspectos, el marcador es un marcador fluorescente. En algunas realizaciones, el marcador comprende un marcador de polarización de fluorescencia. En otros aspectos, el al menos un oligonucleótido cebador o el al menos un oligonucleótido sonda o ambos contiene una o más modificaciones estructurales. En algunas realizaciones, las modificaciones estructurales comprenden modificaciones estabilizantes del dúplex. En ciertos aspectos, las modificaciones estabilizantes del dúplex comprenden nucleótidos modificados. En aspectos adicionales la modificación estabilizante del dúplex comprende una cola conjugada en el extremo 5' de dicho oligonucleótido cebador. En ciertas realizaciones, la cola comprende un intercalador. En otras realizaciones, la cola comprende un engarce de agrupamiento menor. En realizaciones particulares, la detección del ADN modificado comprende el uso de un agente de detección, en el que el agente de detección interactúa con el ADN modificado proporcionando una señal de detección, y en el que la detección de la señal es indicativa de la presencia del ADN modificado en la mezcla de reacción. En algunos aspectos, el agente de detección comprende un agente fluorescente. En ciertas realizaciones, el agente fluorescente cambia sus propiedades de fluorescencia al interactuar con dicho ADN modificado proporcionando de esta manera una señal de detección. En ciertos aspectos, el agente fluorescente comprende un colorante verde SYBR.

En ciertos aspectos, el al menos un oligonucleótido cebador y el al menos un oligonucleótido diana son partes o fragmentos de la misma molécula. En realizaciones particulares, el oligonucleótido sonda es una sonda FRET, en el que la sonda FRET cambia sus propiedades de fluorescencia al formar el complejo con el ADN modificado, y en el que el cambio es indicativo de la presencia del complejo. En algunos aspectos, la sonda FRET comprende una sonda FRET desencadenada por la hibridación. En otros aspectos, la sonda FRET desencadenada por la hibridación es un cebador Scorpion. En ciertas realizaciones, la sonda FRET desencadenada por la hibridación comprende una sonda Beacon. En otras realizaciones, la sonda FRET comprende una sonda FRET escindible. En ciertos aspectos la sonda FRET escindible comprende una sonda TaqMan™.

En algunos aspectos, el al menos un oligonucleótido cebador, oligonucleótido sonda y/o ADN modificado se inmovilizan en un soporte sólido en los estadios de amplificación o detección o en ambos estadios.

Unas realizaciones adicionales proporcionan un kit para llevar a cabo los procedimientos de cualquiera de los procedimientos desvelados, en el que dicho kit comprende (i) al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas y (ii) al menos uno de los componentes: oligonucleótido cebador; ADN polimerasa; y agente de detección. En ciertos aspectos, el kit comprende: al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas; y al menos uno de los componentes seleccionados de entre: dos oligonucleótidos cebadores, en el que dichos oligonucleótidos cebadores se diseñan para proporcionar una amplificación exponencial de dicho ácido nucleico diana; al menos un oligonucleótido sonda; y una ADN polimerasa.

Descripción detallada de la invención

Unos aspectos de la presente invención proporcionan nuevos procedimientos para la detección de ácidos nucleicos que comprenden la amplificación del ácido nucleico utilizando 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos con bases modificadas (dNTP) como se desvela en el presente documento (por ejemplo, que incluyen los de las FIGURAS ejemplares 2-11).

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, los términos, símbolos de bioquímica, química de ácidos nucleicos, biología molecular y genética molecular siguen los de los tratados y textos convencionales en el campo, por ejemplo, Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Kornberg y Baker, *DNA Replication*, Segunda Edición (W.H. Freeman, New York, 1992); Gaits, ed., *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Lehninger, *Biochemistry*, Segunda Edición (Worth Publishers, New York, 1975); Eckstein, ed., *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (Oxford University Press, New York, 1991); y similares. Adicionalmente, para facilitar el entendimiento de la invención, se definen en el presente documento varios términos.

El término "muestra" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera sustancia que contiene o se presume que contiene un ácido nucleico de interés, y por lo tanto incluye una muestra de ácido nucleico, células, organismos, tejidos, fluidos (por ejemplo, líquido raquídeo o fluidos linfáticos), y la muestra incluye pero no se limita a plasma, suero, orina, lágrimas, heces, tractos respiratorio y genitourinario, saliva, fragmentos de diferentes órganos, tejidos, células sanguíneas, muestras de cultivos celulares *in vitro*, aislados naturales de fuentes naturales tales como agua potable, especímenes microbianos, y objetos o especímenes que se sospecha que contienen moléculas de ácido nucleico.

Las expresiones "ácido nucleico diana" o "ácido nucleico de interés" se refieren a un ácido nucleico o un fragmento del ácido nucleico que se va a amplificar y detectar utilizando uno o más procedimientos de la presente invención. Dos o más ácidos nucleicos diana pueden ser, por ejemplo, fragmentos de la misma molécula de ácido nucleico o de diferentes moléculas de ácido nucleico. Como se utiliza en el presente documento, los ácidos nucleicos diana son diferentes si no coinciden en la secuencia de nucleótidos al menos en un nucleótido. En este aspecto, los aspectos de la invención pueden utilizarse para detectar variaciones polimórficas en las que, por ejemplo, dos ácidos nucleicos de interés tienen un grado significativo de identidad en la secuencia, pero se diferencian en pocos nucleótidos (por ejemplo, en inserciones o eliminaciones) o por un solo nucleótido (SNP). Los ácidos nucleicos diana de los presentes aspectos inventivos se pueden derivar de cualquier organismo u otra fuente, incluyendo, pero sin limitarse a procariontes, eucariontes, plantas, animales, y virus, así como a ácidos nucleicos sintéticos. Los ácidos nucleicos diana pueden contener ADN, ARN, y/o variantes o derivados de los mismos. Los ácidos nucleicos diana pueden ser de cadenas sencilla o cadena doble, y cuando un ácido nucleico de interés es, o se presume que sea de doble cadena, la expresión "ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia específica de cualquier cadena del ácido nucleico de doble cadena. Por lo tanto, un complemento completo de cualquier ácido nucleico de cadena sencilla de interés se trata por realizaciones particulares del presente documento como el mismo ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, el "ácido nucleico diana" reside entre dos secuencias de cebador utilizadas para la amplificación y detección. En aspectos particulares, el ácido nucleico de interés se aísla y purifica de una fuente de muestra antes de aplicar los procedimientos de la presente invención. Preferentemente, los ácidos nucleicos diana están suficientemente libres de proteínas y/o cualquier otra sustancia que interfiera la amplificación inventiva y las reacciones de detección. Están disponibles muchos procedimientos reconocidos en la técnica para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos diana, incluyendo kits comerciales e instrumentos especializados. Por ejemplo, se pueden aislar los ácidos nucleicos utilizando una extracción orgánica con un reactivo orgánico de fenol/cloroformo seguido por precipitación en etanol (Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 1, Capítulo 2, Sección I, John Wiley & Sons, New York (1993). El procedimiento de adsorción en fase sólida (Walsh y col. (1991) *Biotechniques*, 10:506-513, Boom y col., Patente de EE. UU. 5.234.809) y la precipitación de ADN inducida por sales (Miller y col (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16:1215) son otras estrategias más conocidas para purificar ácidos nucleicos. Normalmente, las cantidades de ácidos nucleicos de interés en las muestras es limitada, y el ácido nucleico diana necesita, por lo tanto, amplificarse utilizando un procedimiento de amplificación adecuado para facilitar la detección utilizando los procedimientos inventivos.

Los términos "amplificación" y "amplificar" un ácido nucleico diana como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento en el que se generan múltiples copias del ácido nucleico de interés, por ejemplo, en forma de copias de ADN. Se conocen muchos procedimientos y protocolos en la técnica para amplificar ácidos nucleicos

diana.

El término “amplicón” se refiere a un producto o productos de una reacción de amplificación de un polinucleótido, y se puede referir a una población de polinucleótidos de cadena sencilla o doble, que se replican a partir de uno o más ácidos nucleicos de interés. Los amplicones se pueden producir mediante una variedad de reacciones de amplificación cuyos productos son múltiples réplicas que comprenden uno o más ácidos nucleicos diana.

La amplificación puede ser “isotérmica”, como se utiliza en el presente documento en la que la temperatura de la reacción de amplificación no cambia o fluctúa significativamente. Ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no se limitan a: amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) (Walker G.T. y col, Patente de EE. UU. 5.270.184; Dattagupta N. y col, Patente de EE. UU. 6.214.587; Walker G.T. y col (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24,384-353); amplificación en círculo rotatorio (RCA) (Lizardi P., Patente de EE. UU. 5.854.033); amplificación y multimerización isotérmica de diana lineal (LIMA) (Hafner G.J. y col (2001) *BioTechniques*, 30:852-867); amplificación mediada por bucle (LMA) (Notomi T. y Hase T., Patente de EE. UU. 6.410.278; Notomi T. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28, e63); amplificación isotérmica utilizando cebadores de ARN/ADN compuestos o quiméricos (Cleuziat P. y Mandrand B., Patente de EE. UU. 5.824.517; Kurn N. (2001) Patente de EE. UU. 6.251.639); y otros procedimientos. Las tecnologías de amplificación pueden incluir la síntesis y amplificación de moléculas de ARN junto con la amplificación de secuencias de ADN, por ejemplo, la Amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Oehlschlager F. y col (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12811-12816; Davey C. y Malek L.T., Patente de EE. UU. 6.063.603). Se apreciará que las tecnologías de amplificación reconocidas en la técnica varían en aspectos de diseño, complejidad, eficacia, especificidad, precisión y otros parámetros importantes y relevantes en la detección de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la amplificación puede ser lineal o exponencial en función del tipo (y/o ciclos de la PCR).

En realizaciones preferidas, la amplificación de ácidos nucleicos diana se consigue utilizando la “reacción en cadena de polimerasa” (“PCR”) (Mullis K.B. y col, Patente de EE. UU. 4.683.195; Mullis K.B. Patente de EE. UU. 4.683.202). El perfil de PCR que se utiliza más comúnmente emplea dos oligonucleótidos cebadores, uno para cada cadena, que se diseñan de manera que la extensión de un cebador proporciona una matriz para el otro cebador en el siguiente ciclo de PCR. En general, una PCR consiste en repeticiones (o ciclos) de (i) una etapa de desnaturalización, que se para las cadenas de un ácido nucleico de doble cadena que comprende una secuencia diana, seguido por (ii) una etapa de hibridación que permite que los cebadores se hibriden a las posiciones que flanquean la secuencia diana; y (iii) una etapa de extensión que extiende los cebadores en dirección de 5' a 3', formando de esta manera un ácido nucleico ‘amplicón’ que tiene las secuencias complementarias a la secuencia diana. Cada una de las tres etapas anteriores se puede llevar a cabo a una temperatura diferente utilizando un termociclador automático. Los ciclos de PCR se pueden repetir tantas veces como se desee, dando como resultado, al menos en teoría, la acumulación exponencial de un fragmento de ADN diana cuyos términos se definen por los extremos 5' de los cebadores que se utilicen. Las temperaturas particulares, tiempos de incubación de cada etapa, y tasa de cambio entre las etapas depende de muchos factores bien conocidos por los expertos habituados en la técnica relevante, y se pueden encontrar ejemplos relevantes en numerosos protocolos publicados; por ejemplo, McPherson M.J. y col. (1991 y 1995) y similares. Aunque las condiciones de PCR pueden variar sobre un intervalo amplio, en una PCR convencional, un ácido nucleico diana de cadena doble se desnaturaliza a una temperatura >90 °C, los cebadores se hibridan a una temperatura en el intervalo de 50-75 °C, y la extensión se lleva a cabo preferentemente en el intervalo de 72-78 °C. En la PCR que se utiliza para la detección de ácido nucleico, la especificidad de ampliación y el tiempo son factores importantes. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos se amplifican y detectan utilizando una “PCR de detección”.

La expresión “PCR de detección” como se utiliza en el presente documento se refiere a una PCR que se lleva a cabo para amplificar y detectar uno o más ácidos nucleicos diana, y se preferentemente cumple dos requisitos (1) el tiempo de ciclo de la PCR de detección es al menos 10 minutos o menos (preferentemente es menos de 5 minutos, e incluso más preferentemente menos de 2 minutos); y (2) la temperatura más baja de los ciclos de PCR de detección (habitualmente la temperatura de hibridación) debe ser de al menos 50 °C o más (preferentemente esta temperatura es mayor de 55 °C, más preferentemente por encima de 60 °C, e incluso más preferentemente por encima de 65 °C). Como se muestra en los ejemplos del presente documento, unos aspectos de la invención mejoran sustancialmente las propiedades de hibridación de componentes de oligonucleótido utilizados en la amplificación y detección de ácidos nucleicos. Esto a su vez, permite aumentar la temperatura de hibridación de la PCR a valores de temperatura que son óptimas para la extensión del cebador (por ejemplo, 72-75 °C) por ADN polimerasas termoestables, haciendo posible de esta manera la “fusión” de los estadios de hibridación y extensión. Por lo tanto, en una realización preferida, la PCR se lleva a cabo en dos estadios, (i) estadio de desnaturalización de la cadena y (ii) un estadio combinado de hibridación y extensión. El número de ciclos de PCR necesarios para proporcionar una concentración de ácido nucleico diana detectable depende de la carga (cantidad) de ácido nucleico diana inicial, que normalmente es desconocida, y el rendimiento de amplificación en los respectivos ciclos de PCR. La expresión “PCR de detección” engloba formas derivadas de la reacción, que incluyen, pero no se limitan a, “RT-PCR”, “PCR en tiempo real”, “PCR anidada”, “PCR cuantitativa”, “PCR múltiple”, y similares.

En realizaciones particulares, la amplificación y la detección por PCR de ácidos nucleicos diana se consigue utilizando un oligonucleótido cebador. Esta estrategia proporciona una amplificación lineal de un ácido nucleico y necesita sustancialmente más carga de diana inicial o alternativamente más ciclos de PCR para alcanzar niveles de

amplificación comparables al diseño de PCR exponencial.

Cuando el ácido nucleico de interés es ARN, puede convertirse por procedimientos conocidos en ADN/ARN heterodúplex o dúplex de ADNc antes de la PCR; por ejemplo, como se describe en Simpson D. y col (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151:487-492 y Belyavsky A. y col (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17: 2919-2932 y similares. Estos procedimientos emplean una actividad enzimática de “transcriptasa inversa” que puede extender el oligonucleótido cebador hibridado a una matriz de ARN, proporcionando la síntesis del ADN complementario (ADNc) en presencia de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP); a saber, “PCR de transcripción inversa”, o “RT-PCR” como se describe en la Patente de EE. UU. 5.168.038 de Tecott L. y col (1992).

En ciertos aspectos preferidos, la detección del ácido nucleico diana se puede llevar a cabo en “tiempo real”. La detección en tiempo real es posible cuando todos los componentes de detección están disponibles durante la amplificación de la diana y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, agentes tampón, sales, co-factores, neutralizantes, y similares) soportan ambos estadios de la reacción – amplificación y detección, permitiendo de esta manera que un ácido nucleico diana que se va a medir según progresa la reacción de amplificación, disminuyendo el número de etapas de manejo posteriores necesarias para la detección del material amplificado. Por lo tanto, la expresión “PCR en tiempo real” como se utiliza en el presente documento se refiere a una PCR en la cual la cantidad de productos de reacción, por ejemplo, ácido nucleico diana amplificado se controla según progresa la reacción. La PCR en tiempo real se diferencia primeramente en la química de detección para controlar la amplificación de ácido nucleico en la reacción, por ejemplo: Gelfand y col, Patente de EE. UU. 5.210.015 describen el uso de sondas FRET escindibles por 5'-nucleasas (“TaqMan”); Tyagi y col, Patente de EE. UU. 5.925.517 utiliza sondas FRET desencadenadas por la amplificación (“Beacons”). Se pueden encontrar revisiones de los químicos de detección para la PCR en tiempo real en Didenko V.V. (2001) *BioTechniques*, 31: 1106-1121; Mackay I.M. y col (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30 1292-1305, y Mackay J., Landt O. (2007) *Methods Mol. Biol.*, 353 237-262.

La expresión “PCR anidada” como se utiliza en el presente documento se refiere a una PCR en dos estadios en la que el producto de amplificación de una primera PCR se convierte en la muestra para una segunda PCR que utiliza un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une en una localización interna del producto de amplificación de la primera PCR.

La expresión “PCR múltiple” como se utiliza en el presente documento se refiere a una PCR en la que se amplifican y detectan simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana. Habitualmente, esta PCR emplea conjuntos de cebadores específicos de diana para cada secuencia que se va a amplificar.

La expresión “PCR cuantitativa” como se utiliza en el presente documento significa una PCR diseñada para medir la abundancia de una o más secuencias diana específicas en una muestra. Las mediciones cuantitativas se hacen utilizando una o más secuencias de ácido nucleico de referencia que pueden ensayarse por separado o junto con el ácido nucleico diana. Las técnicas para la PCR cuantitativa son bien conocidas en la técnica y se ejemplifican en los siguientes manuscritos: Gu Z. y col (2003) *J. Clin. Microbiol.*, 41:4636-4641; Becker-Andre M. y Hahlbrock K. (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17:9437-9446; Freeman W.M. y col (1999) *Biotechniques*, 26:112-122,124-125; Lutfalla G. y Uze G. (2006) *Methods Enzymol.*, 410:386-400; Clementi M. y col (1993) *PCR Methods Appl.* 2:191-196; Diviacco S. y col (1992) *Gene*, 122:313-320.

La expresión “agente de detección” como se utiliza en el presente documento se refiere en aspectos particulares a cualquier molécula o partícula que se asocia con los ácidos nucleicos de una manera específica y en el que esta asociación del complejo se puede detectar por cualquier medio físico, químico o biológico. Los agentes de detección utilizados más comúnmente son colorantes intercaladores y agentes fluorescentes. Por ejemplo, los productos de amplificación en la PCR se pueden detectar utilizando colorantes intercaladores como se describe por Wittwer C.T. y col en las Patentes de EE. UU. 6.174.670 y 6.569.627.

La expresión “agente fluorescente” significa un agente de detección que proporciona una señal fluorescente. Los agentes fluorescentes preferidos son las moléculas que cambian sus propiedades de fluorescencia al interactuar con ácidos nucleicos proporcionando una señal detectable. El SYBR Green I y II de Invitrogen son ejemplos de agentes fluorescentes que se utilizan comúnmente como se describe en Schneeberger C. y col (1995) *PCR Methods Appl.*, 4:234-238 y Mackay J., Landt O. (2007) *Methods Mol. Biol.*, 353:237-262.

El término “polinucleótido” y “oligonucleótido” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, y significan un polímero lineal de monómeros nucleotídicos. Los polinucleótidos varían en tamaño desde pocas unidades monoméricas, por ejemplo 5-40, cuando se hace referencia habitualmente como “oligonucleótidos”, a varios miles de unidades monoméricas. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función o uso en último término de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden generar de cualquier manera, incluyendo la síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa o una combinación de los mismos. Cuando un polinucleótido u oligonucleótido se representa por una secuencia de letras, por ejemplo, “CCGTATG” se entiende en el presente documento, a menos de que se especifique en el texto otra cosa, que los nucleótidos están en orden 5' → 3' de izquierda a derecha y que “A” denota desoxiadenosina, “C” denota desoxicitidina, “G” denota desoxiguanosina, y “T” denota desoxitimidina, a menos de que se indique otra cosa o sea obvio por el contexto. Habitualmente, los polinucleótidos de ADN comprenden estos cuatro desoxirribonucleósidos unidos por enlaces

fosfodiéster mientras que el ARN comprende cuatro de sus equivalentes con ribosa con ("U") en lugar de "T".

La expresión "nucleósidos naturales" como se utiliza en el presente documento se refiere a cuatro desoxinucleósidos que pueden encontrarse comúnmente en los ADN aislados de fuentes naturales. Los nucleósidos naturales son desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, y desoxitimidina. La expresión también engloba sus equivalentes con ribosa, con uridina en lugar de timidina.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "nucleósidos no naturales" se refiere a análogos de nucleósidos que por medio de cualquier vía son diferentes en su estructura a los nucleósidos naturales para los polímeros de ADN y ARN. Algunos de los ácidos nucleicos de origen natural de interés pueden contener nucleósidos que son estructuralmente diferentes de los nucleósidos naturales definidos anteriormente, por ejemplo, los ADN de eucariotas pueden incorporar 5-metil-citosina y los ARNt son notorios por albergar alguno de los análogos de nucleósido. Sin embargo, como se utiliza en el presente documento en aspectos particulares, la expresión "nucleósidos no naturales" engloba no obstante estas modificaciones de nucleósidos incluso aunque no puedan encontrarse en fuentes naturales. Por ejemplo, la ribotimidina se trata en el presente documento como un nucleósido no natural.

La expresión "dNTP natural" se refiere a un 5'-trifosfato de desoxinucleósido que representa uno de los cuatro nucleósidos naturales como se ha definido anteriormente.

La expresión "dNTP estabilizante de dúplex con bases modificadas" como se utiliza en el presente documento se refiere a un 5'-trifosfato de desoxinucleósido que contiene una base no natural (base modificada) y que, cuando se incorpora a un polímero con otros dNTP en presencia de ADN polimerasa, proporciona un ADN modificado con propiedades de hibridación mejorada (estabilizante del dúplex). Ejemplos de dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas de acuerdo con los aspectos ejemplares, se muestran en la FIGURA 3. Como se utiliza en el presente documento, un dNTP estabilizante de dúplex con bases modificadas es un análogo del dNTP natural respectivo, por ejemplo, d(5-MeC)TP (5-metil citosina) es un análogo del dCTP (citosina), etc. En ciertas realizaciones, un dNTP estabilizante de dúplex con bases modificadas, reemplaza completamente el dNTP natural respectivo. Esto significa, por ejemplo, que si se utiliza el d(5-MeC)TP en la reacción de amplificación, la reacción no contiene dCTP. En otras realizaciones, un dNTP estabilizante de dúplex con bases modificadas representa una fracción del dNTP natural respectivo. Esto significa que tanto el dNTP natural como su análogo están presentes en la mezcla de reacción, y normalmente en el que el dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas representa al menos una fracción 1/20 (un 5 %) de la cantidad molar del dNTP natural respectivo.

La expresión "componente de oligonucleótido" se refiere a cualquier molécula del polinucleótido en la naturaleza que se necesita o ayuda a llevar a cabo las reacciones de amplificación o detección de la invención, o ambas. Los componentes de oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a oligonucleótidos cebadores, sondas, aumentadores de hibridación o escisión, efectores, etc. Los componentes de oligonucleótidos se pueden marcar o tener modificaciones estructurales incluyendo las que se utilizan en los diseños del oligonucleótido cebador y sonda.

La expresión "oligonucleótido cebador" como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla que se hibrida con el ácido nucleico diana y ceba la síntesis enzimática de una segunda cadena de ácido nucleico en presencia de una ADN polimerasa. En este caso, como se utiliza en el presente documento, el ácido nucleico diana "sirve como matriz" para el oligonucleótido cebador. Un "oligonucleótido cebador" puede ser de origen natural, como en una digestión por restricción purificada o se puede producir sintéticamente. En aspectos particulares, un cebador se selecciona para que tenga en su extremo 3' una región que sea sustancialmente complementaria de una cadena de secuencia específica de la matriz. Un cebador debe ser lo suficientemente complementario para hibridarse con la cadena de matriz para que se produzca la elongación del cebador. Una secuencia de oligonucleótido cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la matriz. Por ejemplo, se puede unir un fragmento de nucleótido no complementario en el extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementario de la cadena. Se pueden intercalar en el cebador bases no complementarias o secuencias más largas, a condición de que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la matriz para hibridarse y de esta manera formar un complejo matriz-cebador para la síntesis del producto de extensión del oligonucleótido cebador.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "oligonucleótido sonda" se refiere a un oligómero o polímero utilizando en la detección de un ácido nucleico diana que forma una estructura de dúplex u otro complejo con el ácido nucleico diana, basándose en la complementariedad de al menos una secuencia de la sonda con una secuencia del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos cebadores y sondas de la presente invención pueden "modificarse" o contener "modificaciones estructurales".

La expresión "modificaciones estructurales" se refiere a cualquier sustancia química tal como átomos, restos, residuos, polímeros, engarces o análogos de nucleótido que habitualmente son de naturaleza sintética y que no están presentes comúnmente en los ácidos nucleicos naturales. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "modificaciones estructurales" también incluyen análogos de nucleósido o nucleótido que están raramente presentes en los ácidos nucleicos naturales, e incluyen, pero no se limitan a inosina (hipoxantina), 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2-aminoadenosina, 6-metiladenosina, pseudouridina, y similares.

“Modificaciones estabilizantes del dúplex” se refiere a modificaciones estructurales, que cuando están presentes en ácidos nucleicos de doble cadena proporcionan efectos estabilizantes del dúplex cuando se coparan en términos de estabilidad térmica, habitualmente medido como T_m , con los complejos de ácido nucleico respectivos que no tener la modificación estructural, por ejemplo, que comprenden nucleótidos naturales. Las modificaciones estabilizantes del dúplex son modificaciones estructurales que se aplican más comúnmente a la síntesis de oligonucleótidos cebadores y sondas. Los expertos habituados en la técnica apreciarán que hay ciertas reglas y límites en el uso de las modificaciones estructurales en los oligonucleótidos cebadores. El extremo 3' de los cebadores no debe bloquearse para el inicio de la síntesis de ADN. Por ejemplo, cuando se conjugan engarces de agrupamiento menor (MGB) para aumentar las propiedades de hibridación del cebador, el resto MGB se acopla habitualmente al extremo 5' (Afonina I. y col (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:2657-2660). Ciertos análogos de nucleótido se pueden incorporar en los oligonucleótidos cebadores, aunque el número de estas modificaciones está limitado. Ejemplos de dichos análogos de nucleótido incluyen, pero no se limitan a bases “universales” (Burgner D. y col (2004) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23:755-765) y “ácidos nucleicos bloqueados” (“LNA”) (Latorra D. y col (2003) *Mol. Cell. Probes*, 17:253-259; Latorra D. y col (2003) *Hum. Mutat.*, 22:79-85; Di Giusto D.A. y King G.C. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:e32). Ciertos análogos de nucleótido con bases modificadas son bien tolerados por las ADN polimerasas y estos análogos se pueden utilizar en el diseño de cebadores sin límite. Ejemplos de dichos análogos de nucleótido con bases modificadas incluyen, pero no se limitan a 5-metil citosina y diamino purina (Lebedev Y. y col (1996) *Genet. Anal.*, 13: 15-21). A diferencia de los oligonucleótidos cebadores. Los oligonucleótidos sonda pueden no tener límites en utilizar modificaciones estructurales. Por ejemplo, de acuerdo con Ortiz E. y col (1998) *Mol. Cell. Probes*, 12:219-226, los oligonucleótidos sonda pueden hacerse completamente de monómeros de “ácido nucleico peptídico” (“PNA”); ya que estas sondas no tienen nucleótidos naturales en sus estructuras. La aplicación de otros análogos de nucleótidos con bases modificadas (Lebedev Y. y col (1996) *Genet. Anal.*, 13: 15-21) o con el azúcar modificado como el LNA (Johnson M.P. y col (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32: e55; Simeonov A. y Nikiforov T.T. (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30:e91) también se aplica ampliamente a las sondas. Los oligonucleótidos sonda pueden albergar un resto MGB conjugado en cualquier extremo. Por ejemplo, las sondas FRET conjugadas con 5'-MGB no se escinden en la PCR de detección y estas sondas proporcionan una señal debido a un mecanismo de acción desencadenado por la hibridación como se describe en Vermeulen N. y col (2002) *J. Clin. Ligand Assay*, 25:268-275. Por el contrario, las sondas FRET conjugadas con 3'-MGB no se bloquean por la degradación de nucleasas 5' y estas sondas generan señales fluorescentes debido a la escisión por la polimerasa Taq como se ejemplifica en Kutayavin I.V. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28: 655-661.

“Hibridar”, “hibridación” o “emparejamiento” como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso de interacción entre dos o más polinucleótidos que forman un complejo complementario mediante un emparejamiento de bases que es más comúnmente un dúplex o complejo de doble cadena como se describió originalmente en Marmur J., Lane D. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:453-461 y Doty P. y col (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:461-476. La estabilidad de un dúplex de ácido nucleico se mide por la temperatura de fusión o “ T_m ”. La T_m de un dúplex de ácido nucleico particular en condiciones especificadas es la temperatura a la que, de media, la mitad de los pares de bases se han disociado.

“Propiedades de hibridación” de un polinucleótido se refiere a la capacidad de este polinucleótido o un fragmento del mismo para formar un complejo específico de secuencia con otro polinucleótido complementario o su fragmento. “Propiedades de hibridación” también se refiere en general en el presente documento a la estabilidad del complejo complementario. En este aspecto, las “propiedades de hibridación” se utiliza de manera similar a “temperatura de fusión” o “ T_m ”.

“Propiedades de hibridación aumentadas” o “mejoradas” de un polinucleótido como se utiliza en el presente documento, se refiere a un aumento de la estabilidad de un complejo de este polinucleótido con su secuencia complementaria debido a cualquier factor, incluyendo pero no limitándose a un cambio en las condiciones de reacción tales como el pH, concentración y composición de sales (por ejemplo, un aumento den la concentración de ion magnesio, la presencia de agentes estabilizantes del complejo tal como intercaladores o engarces de agrupamiento menor, etc.). Las propiedades de hibridación de un polinucleótido u oligonucleótidos también se pueden alterar para aumentar o disminuir la longitud del polinucleótidos u oligonucleótido. La causa o base del aumento de la propiedad de hibridación se encuentra habitualmente en el contexto del presente documento. Las propiedades de hibridación de un polinucleótido también se pueden aumentar por una modificación estructural del polinucleótido. Por ejemplo, el uso de dNTP estabilizantes con bases modificadas en los ensayos de la presente invención da lugar a la amplificación de un ADN modificado en el que el ADN modificado se dice que tiene propiedades de hibridación aumentadas. Este es el uso más común de la expresión “propiedades de hibridación aumentadas” como se utiliza en el presente documento. Esto significa que la estabilidad térmica o T_m de un complejo complementario de este ADN modificado, por ejemplo, con oligonucleótidos sonda o cebadores, es mayor que la de un ADN que comprende las bases naturales respectivas.

“Temperatura de fusión” o “ T_m ” se refiere a la temperatura a la que un complejo complementario de ácidos nucleicos, habitualmente de doble cadena, llega a estar medio disociado en cadenas sencillas. Estas expresiones también se utilizan en la descripción de estabilidades de las estructuras secundarias de polinucleótidos en el que dos o más fragmentos del mismo polinucleótido interactúa de manera complementaria entre ellos formando complejos, por ejemplo, estructuras tipo horquilla, etc. Una estimación simple del valor de T_m se puede calcular utilizando la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G + C)$, cuando un ácido nucleico está en una solución acuosa con NaCl

1 M. Se pueden hacer cálculos más precisos utilizando la termodinámica de pares de bases de una estrategia de “vecinos más cercanos” (Breslauer K.J. y col (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3746-3750; SantaLucia J. Jr. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1460-1465).

El término “marcador” se refiere a cualquier átomo o molécula que se puede utilizar para proporcionar una señal detectable y que se puede unir a un ácido nucleico u oligonucleótido. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a isótopos, radiomarcadores tales como ^{32}P , restos de unión tales como biotina; haptenos tales como dioxigenina; marcadores de masa luminogénicos, restos fosforescentes o fluorescentes, colorantes fluorescentes solos o en combinación con otros colorantes o restos que suprimen o cambian el espectro de emisión por el efecto FRET. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, rayos X, difracción o absorción, magnetismo, actividad enzimática, espectrometría de masas, afinidad de unión, y similares. Un marcador puede ser un resto cargado, o de manera alternativa, puede tener carga neutra. Los marcadores pueden incluir o consistir en una secuencia de ácido nucleico o proteína, a condición de que la secuencia que comprende el marcador sea detectable.

“Marcador fluorescente” se refiere a un marcador que proporciona una señal fluorescente. Los marcadores fluorescentes son comúnmente colorantes fluorescentes, pero pueden comprender cualquier molécula que incluya, pero no se limita a una macromolécula tipo proteína o una partícula fabricada con un material inorgánico como puntos cuánticos como se describe en Robelek R. y col (2004) *Anal. Chem.*, 76: 6160-6165.

“FRET” es una abreviatura de Efecto de transferencia de energía por resonancia de Forster. FRET es una interacción dependiente de la distancia que ocurre entre dos moléculas colorantes en la que la excitación se transfiere de un fluoróforo donante a un receptor mediante una interacción dipolo-dipolo sin emisión de un fotón. Como resultado, la molécula donante de fluorescencia se inactiva y la molécula receptora se excita. La eficacia del FRET depende de las propiedades espectrales, orientación relativa y distancia entre los fluoróforos donante y receptor (Forster T. (1965) *Delocalized excitation and excitation transfer*. En Sinanoglu, O. (ed.), *Modern Quantum Chemistry*, Istanbul Lectures, part III. Academic Press, New York: 93-137). En el caso de una orientación aleatoria del dipolo, y con un buen solapamiento entre el espectro de emisión del donante y el espectro de absorción del receptor, la eficacia de FRET depende del inverso de un sexto de potencia de la separación intermolecular (Clegg R.M. (1992) *Methods Enzymol.*, 211:353-388; Clegg R.M. (1995) *Curr. Opin. Biotech.*, 6:103-110; Selvin P.R. (1995) *Methods Enzymol.*, 246:300-334). Esto hace que FRET sea útil sobre distancias comparables a las dimensiones de macromoléculas biológicas (Stryer L. y Haugland R.P. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58:719-726) y este efecto se utiliza ampliamente en investigación biomédica y particularmente en diseños de sondas para la detección de ácidos nucleicos (Didenko V.V. (2001) *BioTechniques*, 31: 1106-1121).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “sonda FRET” se refiere a un oligonucleótido fluorescente que se utiliza para la detección de un ácido nucleico de interés en el que la detección se basa en el efecto FRET. La sonda FRET contiene comúnmente dos cromóforos. El cromóforo receptor normalmente es un colorante no fluorescente que se escoge para inactivar la fluorescencia del fluoróforo indicador (Eftink M.R. (1991) En Lakowicz J.R. (ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, V.2:53-126). La formación de los híbridos específicos de secuencia entre el ácido nucleico diana y las sondas dan lugar a un cambio de las propiedades de fluorescencia de la sonda proporcionando la detección del ácido nucleico diana. Se han publicado hasta la fecha muchos diseños de detección que exploran el efecto FRET. Las sondas FRET más comunes que se pueden utilizar para la práctica de la presente invención son: TaqMan™ (Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) *Curr. Opin. Biotech.*, 9:43-48; Livak K.J. y col (1995) *PCR Methods and Applications*, 4:357-362); Beacon (Tyagi S. y Kramer F.R. (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14:303-308; Bonnet G. y col (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 6171-6176; Tyagi S. y col (2000) *Nat. Biotechnol.*, 18:1191-1196; Marras S.A.E. y col (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30:e122; Piatek A.S. y col (1998) *Nat. Biotechnol.*, 16 359-363; Lewin S.R. y col (1999) *J. Virol.*, 73:6099-6103); Eclipse (Afonina I.A. y col (2002) *BioTechniques*, 32:940-949); cebadores Scorpion (Whitcombe D. y col (1999) *Nature Biotech.*, 17:804-807; Thelwell N. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:3752-3761); sondas de auto-inactivación (Livak K.J. y col, Patente de EE. UU. N.º 5.723.591). La sonda FRET puede comprender una única molécula de oligonucleótido o más de un oligonucleótidos; por ejemplo, las sondas de hibridación adyacente (Heller M.J. y Morrison L.E. (1985) En Kingsbury, D.T. y Falkow, S. (eds.), *Rapid Detection and Identification of Infectious Agents*. Academic Press, New York, 245-256; Cardullo R.A. y col (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8790-8794; Gundry C.N. y col (1999) *Genet. Test.*, 3:365-370). Una revisión detallada de distintos diseños y aplicaciones de los oligonucleótidos sonda FRET se puede encontrar en Didenko V.V. (2001) *BioTechniques*, 31: 1106-1121.

Como se utiliza en el presente documento, “ADN modificados” se refiere a un ADN que incorpora al menos uno o preferentemente más de un nucleótido estabilizante del dúplex con bases modificadas. La amplificación de los ADN modificados es un componente clave de la presente invención. En realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos diana se detectan amplificando ADN diana modificados utilizando oligonucleótidos cebadores y ADN polimerasa en presencia de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP) que contienen al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas. Sin embargo, como se utiliza en el presente documento, los “ADN modificados” pueden contener adicionalmente cualquier modificación estructural del nucleótido distinta de la estabilización del dúplex con bases modificadas, su es necesaria su presencia por la elección de una reacción de amplificación o detección específicas o que proporcione ADN con propiedades específicas distintas del aumento de hibridación. Por ejemplo, la amplificación SDA descrita en Walker G.T. y col (1993) Patente de EE. UU. 5.270.184 necesita el uso de un

análogo α -tio dATP para promover el mellado de una cadena de los ADN de doble cadena. Los ADN modificados pueden incorporar adicionalmente, por ejemplo, desoxiuridina (dU) monomérica. Aunque se sabe que esta modificación de base desestabiliza el dúplex de ADN, el uso de dichos ADN modificados está en el ámbito de la presente invención debido a que el fin de la aplicación de dU es habitualmente la prevención del traspaso de contaminación de muestra a muestra como se describe en Gelfand D.H. y col (1995) Patente de EE. UU. 5.418.149.

Una "mezcla de reacción" se refiere en general a una solución que contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación o detección o ambas, que además de los componentes principales tales como los ácidos nucleicos diana, ADN polimerasas, oligonucleótidos cebadores, sondas u otros componentes oligonucleotídicos, puede incluir (por sin limitarse a la inclusión de) agentes de detección, enzimas especializadas, 5'-trifosfatos de nucleósidos incluyendo los modificados, agentes tampón para mantener el pH en un nivel seleccionado durante la reacción, sales, co-factores y aditivos, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, glicerol, poli(etilenglicol), dimetil sulfoxido o formamida y similares.

Como se utiliza en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema para el suministro de materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen elementos que permiten el almacenamiento, transporte, o suministro de componentes de reacción tal como oligonucleótidos, componentes tampón, aditivos, amplificadores de la reacción, enzimas y similares en envases apropiados de una localización a otra provisto comúnmente con instrucciones escritas para llevar a cabo el ensayo. Los kits pueden incluir uno o más contenedores o cajas que contienen los reactivos de reacción relevantes y los materiales de apoyo. El kit puede comprender dos o más recipientes diferentes en los que en cada uno de estos recipientes se incluye una parte del total de componentes del kit. Los recipientes se pueden suministrar al receptor juntos o por separado.

La expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier material que proporciona una estructura sólida con la que se puede unir otro material. Dichos materiales pueden incluir, pero no se limitan a silicona, plástico, metal, cristal, superficies cerámicas, y similares. El soporte sólido puede ser de naturaleza rígida o no rígida como geles, gomas, polímeros, etc. y puede ser cualquier tipo de forma incluyendo formas esféricas como perlas. Ciertas realizaciones de la presente invención tienen al menos uno de los componentes de la reacción tales como los oligonucleótidos cebadores, oligonucleótidos sonda o ADN modificados inmovilizados en el soporte sólido en estadios de amplificación o detección o ambos. Un material biológico esta "inmovilizado" en un soporte sólido cuando se asocia con el soporte sólido mediante una interacción química o física no aleatoria. La inmovilización o unión puede ser mediante un enlace covalente utilizando una molécula espaciadora especial o un grupo de engarce. Sin embargo, no es necesario que la inmovilización sea covalente o permanente.

Como se utiliza en el presente documento, "ensayo de detección" o "ensayo" se refiere a una reacción o cadena de reacciones que se llevan a cabo para detectar ácidos nucleicos de interés. El ensayo puede comprender múltiples estadios incluyendo las reacciones de amplificación y detección que se llevan a cabo posteriormente o en tiempo real, el aislamiento de ácido nucleico y las etapas intermedias de purificación, inmovilización, marcado, etc.

Descripción detallada de aspectos ejemplares

Unos aspectos particulares de la invención se refieren a procedimientos mejorados para la detección de ácidos nucleicos que comprenden la amplificación y detección de ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, ADN) con propiedades de hibridación mejoradas. En aspectos preferidos, los ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, ADN) se producen y amplifican por medio de extensión de un oligonucleótido cebador en presencia de una ADN polimerasa y dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas. Los presentes aspectos inventivos benefician los estadios de amplificación o detección o ambos, estabilizando los complejos de oligonucleótidos cebadores y sondas con los ADN modificados.

En ciertos aspectos, la PCR es una tecnología de amplificación de ADN preferida. En un aspecto, la invención ayuda a reducir la diferencia de estabilidad entre los pares de bases A/T y G/C, proporcionando la estabilización selectiva de dúplex ricos en A/T, haciendo posible de esta manera diseños de ensayo que engloban la detección de secuencias de ácido nucleico que eran indetectables en estrategias convencionales.

En ciertos aspectos, la invención permite el aumento de la temperatura de la reacción de PCR hasta las condiciones óptimas y la aceleración de los ensayos de detección de ácidos nucleicos.

Unos aspectos adicionales, permiten la reducción de la longitud del oligonucleótido cebador y/o sonda cuando la reducción de la longitud es beneficiosa.

En una realización preferida, la invención se refiere a un ensayo de PCR en tiempo real mejorado, en el que los ácidos nucleicos de interés se detectan según progresa la reacción utilizando sondas FRET.

En otra realización preferida más, la invención se refiere a un ensayo de PCR en tiempo real mejorado que se lleva a cabo para determinar la cantidad de un ácido nucleico diana en una muestra.

En realizaciones particulares, la invención proporciona procedimientos mejorados para la amplificación y detección de más de un ácido nucleico de interés, por ejemplo, en una PCR múltiple.

En general, los aspectos inventivos desvelados en el presente documento benefician virtualmente cualquier ensayo de detección de ácido nucleico que se basa en la síntesis, amplificación y detección de moléculas de ADN, a condición de que al menos un componente oligonucleotídico (por ejemplo, un oligonucleótido cebador(es) y sonda(s)) se hibridan con los ADN durante los estadios de amplificación o detección, o durante ambos estadios. De acuerdo con unos aspectos de la presente invención, cuando un componente oligonucleotídico se hibrida con un ADN modificado, forma un complejo (por ejemplo, un dúplex complementario, un complejo de extensión para cebadores) y ese complejo es más estable gracias al ADN modificado de la invención que tiene propiedades de hibridación mejores en comparación con las estrategias convencionales en las que el ADN no está modificado con análogos de bases que estabilizan el dúplex.

Los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención puede beneficiar los ensayos de detección de ácido nucleico de varias maneras, incluyendo pero sin limitarse a (i) en el gasto y simplificación del diseño de componentes oligonucleotídicos para los estadios de amplificación y detección o ambos, (ii) implicando en el diseño secuencias de ácido nucleico diana que eran inalcanzables (no se podían ensayar) utilizando estrategias convencionales (por ejemplo, debido a un elevado contenido en A/T), (iii) aumentando la temperatura de reacción de los estadios de amplificación o detección o más cuando sea posible (por ejemplo, no restringido por la limitación térmica de las enzimas clave), (iv) la aceleración de los estadios de amplificación o detección o ambos (por ejemplo, reducción del tiempo de ensayo), (v) permite el uso de componentes oligonucleotídicos más cortos, reduciendo de esta manera el coste de la fabricación del componente oligonucleotídico, etc.

En aspectos particulares, los procedimientos reflejan un número de factores determinados por la elección de las reacciones de amplificación o detección de ADN, o combinaciones de los mismos. Se han publicado hasta la fecha numerosas tecnologías para la amplificación y detección de ADN, y las directrices para utilizar la presente invención se proporcionan y ejemplifican en el presente documento como referencia de las técnicas más reconocidas que se utilizan comúnmente. En general, se anticipa que la contribución positiva (ventajas) de la invención crecerá al aumentar las temperaturas de reacción del ensayo, proporcionando un beneficio máximo a los sistemas que se llevan a cabo a temperaturas que exceden los 40 °C, preferentemente 50 °C, preferentemente 55 °C, más preferentemente 60 °C, más preferentemente 65 °C y más preferentemente 70 °C.

La aplicación de la invención beneficia mucho los ensayos de detección basados en PCR. Por ejemplo, unos aspectos inventivos hacen posible un aumento de la temperatura de la PCR (temperatura de hibridación) acelerando de esta manera los ensayos y moderando o eliminando esencialmente los problemas del PCR reconocidos en la técnica asociados con la mala amplificación (por ejemplo, formación de dímeros de cebador), y adicionalmente mejora las capacidades de multiplexado de la PCR.

Los aspectos inventivos desvelados en el presente documento se practican fácilmente, y son baratos en comparación con las tecnologías de la técnica anterior para la mejora de las propiedades de hibridación de oligonucleótidos cebadores y sondas en ensayos de detección de ácidos nucleicos (véase, "ANTECEDENTES", en el presente documento). Además, los presentes aspectos inventivos pueden combinarse opcional y eficazmente con estas estrategias convencionales como se demuestra en ciertos ejemplos del presente documento.

I. Amplificación de ADN modificado con propiedades de hibridación mejoradas

En ciertas realizaciones, los ADN modificados con propiedades de hibridación mejoradas se amplifican utilizando un "reacción de amplificación isotérmica". Las reacciones de amplificación de ADN isotérmicas se llevan a cabo normalmente a una temperatura estable o constante. Ejemplos de reacciones de amplificación isotérmica que pueden ser útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a *Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA)* (Walker G.T. y col, Patente de EE. UU. 5.270.184; Dattagupta N. y col, Patente de EE. UU. 6.214.587; Walker G.T. y col (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24:384-353; Walker G.T. y col (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392 - 396; Spargo C.A. y col (1996) *Molecular and Cellular Probes*, 10 247-256), *amplificación en círculo rotativo (RCA)* (Lizardi P., Patente de EE. UU. 5.854.033; Baner J. y col (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26:5073-5078), *Multimerización y Amplificación isotérmica de diana lineal (LIMA)* (Hafner G.J. y col (2001) *BioTechniques*, 30:852-867), *Amplificación mediada por bucle (LMA)* (Notomi T. y Hase T., Patente de EE. UU. 6.410.278; Notomi T. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28, e63), *amplificación isotérmica utilizando cebadores ARN/ADN compuestos o quiméricos* (Cleuziat P. y Mandrand B., Patente de EE. UU. 5.824.517; Kurn N. (2001) Patente de EE. UU. 6.251.639), *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)* (Oehlenschläger F. y col (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:12811-12816; Davey C. y Malek L.T., Patente de EE. UU. 6.063.603), *Amplificación dependiente de helicasa (HAD)* (Vincent M., Xu Y. y Kong H. (2004) *EMBO reports*, 5:795 - 800; An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H.-J., Wytiaz J., y Kong H. (2005) *JBC*, 280:28952-28958), y muchos otros procedimientos. Una revisión de las reacciones de amplificación isotérmica utilizadas comúnmente se puede encontrar en Andras S.C. y col (2001) *Mol. Biotechnol.*, 19:29-44, y una guía detallada para llevar a cabo la reacción de amplificación de ADN independientemente de cualquier esquema de amplificación particular de la elección se puede encontrar en las referencias citadas anteriormente, que a su vez contienen referencias a otras publicaciones de la misma naturaleza objeto y que también pueden ser útiles para llevar a cabo cualquier reacción de amplificación particular.

En aspectos particulares, los ADN modificados con propiedades de hibridación mejoradas se pueden preparar utilizando tecnologías isotérmicas referenciadas anteriormente a condición de que al menos uno o preferentemente más de uno de los dNTP naturales de las reacciones se sustituyan completa o parcialmente por los respectivos dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas que se ejemplifican en la FIGURA 3.

En ciertos aspectos, el ADN modificado interactúa con al menos uno y preferentemente más de uno oligonucleótido cebador de una manera específica de secuencia que forma un complejo de extensión (por ejemplo, un dúplex complementario) y este complejo es más estable gracias al ADN modificado de la invención que tiene propiedades de hibridación mejoradas en comparación con las estrategias convencionales en las que el ADN no está modificado con análogos de bases estabilizantes del dúplex. Esto beneficia el estado de amplificación de las maneras expuestas anteriormente. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden aplicar ciertos ajustes o variaciones de los procedimientos para el uso de los dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas, dependiendo de la naturaleza de una reacción de amplificación particular, particularmente los que comprende enzimas distintas a la ADN polimerasa (endonucleasas de restricción, ARN polimerasas, etc.). Las aplicaciones de los dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas no interferirán preferentemente con dichas otras actividades enzimáticas cuando son componentes clave de la reacción o síntesis de ADN. Esto puede dictar la elección de los dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas que se van a utilizar en esquemas de amplificación particulares y la elección se puede hacer basándose en las propiedades de estas enzimas, que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la amplificación SDA necesita el uso de un análogo α -tio dNTP para promover la mella de solo una cadena de los ADN de cadena doble. Por lo tanto, el uso de un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas respectivos se evitará preferentemente para dichas aplicaciones particulares. Dependiendo de la naturaleza de las endonucleasas de restricción utilizadas en la SDA; estas enzimas pueden ser sensibles, por ejemplo, a la metilación de citosina, y el uso de 5-metil-citosina en la preparación del ADN modificado preferentemente se limitará o evitará. Las directrices para las propiedades de las endonucleasas de restricción se pueden encontrar en Ausubel F.M y col, eds., (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, 9.1.1-9.1.3. La aplicación de distintos dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas, por ejemplo, el análogo 2,6-diaminopurina, puede limitarse a las reacciones NASBA debido a luso de dichos análogos puede alterar las propiedades de la región promotora de la ARN polimerasa necesaria en el diseño de cebadores para estar amplificación particular. Cuando se desee, el dTTP se reemplaza por un análogo dUTP proporcionando el respectivo ADN modificado. Estas es una estrategia bien conocida para la prevención la contaminación que se transmite de muestra a muestra como se describe en Gelfand D.H. y col (1995) Patente de EE. UU. 5.418.149. La aplicación de dichos procedimientos anti-transmisión puede reducir o limitar el uso de análogos de dNTP de desoxiuridina 5-sustituidos particulares que se ejemplifican en la FIGURA 3.

La PCR de detección es un procedimiento preferido para la amplificación de ADN modificados de la presente invención. En una realización, la PCR de detección se puede llevar a cabo utilizando un oligonucleótido cebador que proporcione una amplificación lineal de los ADN modificados diana. En una realización preferida, la PCR de detección se lleva a cabo utilizando dos oligonucleótidos cebadores que se diseñan para proporcionar una amplificación exponencial.

Un ejemplo del diseño del cebador para la PCR se muestra en la FIGURA 4. La FIGURA 4 muestra secuencias de un oligodesoxirribonucleótido 96-mérico diana (SEQ ID NO: 24), cebadores de PCR directo (SEQ ID NO: 25) e inverso (SEQ ID NO: 26) y una sonda fluorescente 22-mérica (SEQ ID NO: 27) que se utilizan en los ensayos TaqMan® en aspectos ejemplares de la presente invención. Se llevaron a cabo los ensayos Scorpion utilizando el cebador inverso (SEQ ID NO: 26) y el cebador Scorpion (SEQ ID NO: 28), una sonda FRET que forma una horquilla (las secuencias del extremo complementarias están subrayadas) se conecta al extremo 5' del cebador directo mediante un engarce C18 largo y flexible (Glen Research). Los cebadores y la sonda que se utilizaron se fabricaron a partir de nucleósidos todos naturales, o de manera alternativa incorporaban bases modificadas. Cuando se utilizaban oligonucleótidos con bases modificadas, las posiciones que se muestran con la fuente en negrita se sustituyeron con 2,6-diamino-purina o 5-metil citosina, respectivamente. Se subraya den la secuencia de SEQ ID NO: 24 el sitio de unión del cebador inverso (que se muestra en orientación inversa, 3' $\rightarrow$ 5'). "FAM" se refiere a 6-fluoresceína y "Q" se refiere a BLACK HOLE QUENCHER™ (BHQ1) de Biosearch Technologies.

Un ejemplo de las mezclas de reacción para la PCR de detección se puede encontrar en la FIGURA 5. Las FIGURAS 5A-5D muestran resultados ejemplares del control de la fluorescencia obtenidos de los ensayos de detección TaqMan® durante la PCR en tiempo real en un SmartCycler® (Cepheid). Las estructuras del oligonucleótido diana (SEQ ID NO: 24), cebadores de PCR directo (SEQ ID NO: 25) e inverso (SEQ ID NO: 26) y la sonda TaqMan® (SEQ ID NO: 27) que se utilizan son como en la FIGURA 4. Las concentraciones finales de los componentes en las mezclas de reacción (25 μ l) al inicio de la PCR eran: cebadores de PCR directo e inverso – 200 nM; oligonucleótido diana – 10.000 copias por reacción; dNTP – 200 mM de cada uno; ADN polimerasa JUMP START™ (Sigma) – 0,05 U/ml en 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Se restó la fluorescencia de fondo. El perfil de ciclado de la PCR (95 ° 2') $\rightarrow$ (95 ° 10" $\rightarrow$ X ° 45")₅₅ se utilizó con la temperatura de hibridación "X" que varía de 65 a 75 °C.

La FIGURA 5A muestra un conjunto de experimentos donde los cebadores no modificados y la sonda TaqMan® se emplearon con dNTP todos naturales.

La FIGURA 5B muestra los resultados de experimentos análogos a los de la FIGURA 5A, pero en los que el 5'-trifosfato de 2'-desoxirriboadenosina (dATP) se sustituía completamente con el 5'-trifosfato del nucleósido desoxirribo-2,6-diaminopurina (d(-amA)TP).

En la FIGURA 5C muestra los cebadores y sondas con bases modificadas que se utilizan en el conjunto de experimentos ejemplares, pero en los que todos los trifosfatos de nucleósidos (dNTP) eran naturales.

La FIGURA 5D representa ensayos de TaqMan® en tiempo real donde ambas modificaciones del sistema de la FIGURA 5B y la FIGURA 5C se combinaban y se empleaban al mismo tiempo; es decir, se utilizaban cebadores y sondas con bases modificadas con sustitución completa de dATP por d(2-amA)TP.

Una reacción PCR de detección inventiva típica para amplificar ADN modificados comprende un ácido nucleico diana, un par de oligonucleótidos cebadores, una ADN polimerasa, y una mezcla de 5'-trifosfatos de desoxinucleósido que contiene al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas. El ion magnesio está presente preferentemente en la mezcla de reacción debido a que hace posible la actividad catalítica de muchas ADN polimerasas. Los componentes de reacción se mezclan utilizando la solución de materia prima apropiada para proporcionar, por ejemplo, las siguientes concentraciones en una mezcla de reacción de 25 ml: cebadores de PCR – 200 nM cada uno; ADN polimerasa Jump start (Sigma) – 0,05 u/ml en 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) y dNTP – 200 mM de cada uno; en los que uno o más de los cuatro dNTP naturales (por ejemplo, dTTP, dCTP, dGTP o dATP) se sustituyen completa o parcialmente con dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas, algunos ejemplos de los cuales se muestran en la FIGURA 3. Además de los componentes enumerados anteriormente, una mezcla de reacción de PCR de detección puede incluir, pero no se limita a la inclusión de agentes de detección, enzimas especializadas diferentes de la ADN polimerasa, sales distintas del KCl, y MgCl₂, cofactores y aditivos, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, glicerol, poli(etilenglicol), dimetil sulfóxido o formamida y similares.

La concentración de ácido nucleico diana en la PCR de detección normalmente es desconocida, y puede ser tan baja como 1 copia (molécula) por reacción. Los ácidos nucleicos diana para su uso con la invención se puede derivar de cualquier organismo u otra fuente, incluyendo, pero no limitadas a procariotas, eucariotas, plantas, animales, y virus, así como ácidos nucleicos sintéticos. Los ácidos nucleicos diana pueden contener ADN, ARN, y/o variantes de los mismos. El ácido nucleico diana puede ser de cadena sencilla o doble cadena. Cuando el ácido nucleico de interés es un ADN de doble cadena normalmente se desnaturaliza antes de llevar a cabo el ciclo de temperatura de PCR incubando la mezcla de reacción, por ejemplo, a 95 °C durante 2 minutos. Cuando una ADN polimerasa bloqueada por anticuerpos (por ejemplo, ADN polimerasa JumpStart (Sigma)) se utiliza en la PCR de detección, la incubación en calor inicial (95 °C durante 2 minutos) también activa la polimerasa. Los ácidos nucleicos de interés se pueden aislar y purificar a partir de fuentes de muestra antes de aplicar los procedimientos de la presente invención. Preferentemente, los ácidos nucleicos diana están suficientemente libres de proteínas y cualquier otra sustancia que interfiera las reacciones de amplificación y detección. Están disponibles muchos procedimientos para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos diana incluyendo kits comerciales e instrumentos especializados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar utilizando extracción orgánica con un reactivo orgánico de fenol/cloroformo seguido por precipitación en etanol (Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1, Capítulo 2, Sección I, John Wiley & Sons, New York (1993). El procedimiento de adsorción en fase sólida (Walsh y col. (1991) Biotechniques, 10:506-513, Boom y col., Patente de EE. UU. 5.234.809) y la precipitación de ADN inducida por sales (Miller y col (1988) Nucleic Acids Res., 16:1215) son otras estrategias más conocidas para purificar ácidos nucleicos. Cuando el ácido nucleico de interés es un ARN, se puede convertir a heterodúplex ADN/ARN o a dúplex de ADNc antes de la PCR por procedimientos conocidos; por ejemplo, como se describe en Simpson D. y col (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 487-492 y Belyavsky A. y col (1989) Nucleic Acids Res., 17: 2919-2932 y similares. Estos procedimientos emplean transcriptasas inversas que pueden extender un oligonucleótido cebador hibrida a una matriz de ARN, proporcionando la síntesis del ADN complementario (ADNc) en presencia de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP); es decir, la "PCR de transcripción inversa" o "RT-PCR", y como se describe en la Patente de EE. UU. 5.168.038 de Tecott L. y col (1992). Ciertas reacciones de amplificación como, por ejemplo, NASBA, no necesita la síntesis de la primera copia de ADNc y estas técnicas pueden ser útiles para la detección de ARN víricos.

Una reacción típica de PCR consiste en la repetición de (i) una etapa de desnaturalización que separa las cadenas de un ácido nucleico de doble cadena seguida por (ii) una etapa de hibridación, que permite a los cebadores hibridarse con las posiciones que flanquean una secuencia diana; y después (iii) una etapa de extensión que extiende los cebadores en una dirección 5' a 3' formando de esta manera una cadena de ADN complementaria de la secuencia diana. Cada una de las etapas anteriores se puede llevar a cabo a una temperatura diferente utilizando un termociclador automático. Los ciclos de la PCR se pueden repetir tantas veces como se dese dando como resultado una acumulación exponencial de un fragmento de ADN diana cuyos extremos se definen por los extremos 5' de los cebadores utilizados. Las temperaturas particulares, los tiempos de incubación de cada etapa y las tasas de cambio entre las etapas depende de muchos factores bien conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden encontrar ejemplos en numerosos protocolos publicados, por ejemplo, McPherson M.J. y col. (1991 y 1995) y similares. Aunque las condiciones de la PCR pueden variar sobre un intervalo significativo, en una PCR convencional, se desnaturaliza normalmente un ácido nucleico diana de doble cadena a una temperatura >90 °C, los cebadores se hibridan a una temperatura en el intervalo de 50-75 °C, y la extensión se lleva a cabo preferentemente a una

temperatura en el intervalo de 72-78 °C. La especificidad de amplificación y el tiempo del ensayo son factores importantes en la PCR de detección.

Realizaciones de PCR en dos etapas

Como se ejemplifica en las FIGURAS 5-11, y en particular en las FIGURAS 5, 6, 9, 10 y 11, la presente invención mejora sustancialmente las propiedades de hibridación de los componentes de oligonucleótido utilizados en la detección de ácido nucleico, y esto a su vez permite el aumento de la temperatura de hibridación de la PCR hasta una temperatura en el intervalo de 72-75 °C, que es óptima para la actuación de ADN polimerasas termoestables tales como Taq. En aspectos preferidos, por lo tanto, esto da lugar a la "fusión" de los estadios de hibridación y extensión.

Las FIGURAS 5A-5D (expuestas con detalle en el presente documento anteriormente) muestra los resultados ejemplares de control de fluorescencia utilizando los procedimientos inventivos en el contexto de ensayos de detección TaqMan® durante la PCR en tiempo real en un SmartCycler™ (Cepheid). Las estructuras del oligonucleótido diana (SEQ ID NO: 24), cebadores de PCR directo (SEQ ID NO: 25) e inverso (SEQ ID NO: 26) y la sonda TaqMan® (SEQ ID NO: 27) que se utilizan son las de la FIGURA 4. La FIGURA 5A muestra un conjunto de experimentos ejemplares en los que los cebadores no modificados y la sonda TaqMan® se emplearon con dNTP todos naturales. La FIGURA 5B muestra los resultados de experimentos ejemplares que son análogos a los de la FIGURA 5A, pero en los que el 5'-trifosfato de 2'-riboadenosina (dATP) se sustituyó completamente por 5'-trifosfato de nucleósido 2'-desoxirribo-2,6-diaminopurina (d(2-amA)TP). En la FIGURA 5C, se utilizaron cebadores con bases modificadas y la sonda en el conjunto de experimentos ejemplares, pero todos los trifosfatos de nucleósidos (dNTP) eran naturales. La FIGURA 5D representa los ensayos TaqMan® en tiempo real en los que se combinaron ambas modificaciones de la FIGURA 5B y la FIGURA 5C y se emplearon al mismo tiempo; es decir, se utilizaron cebadores de bases modificadas y la sonda, con sustitución completa de dATP por d(2-amA)TP.

Las FIGURAS 6A-6D muestran los resultados de los ensayos TaqMan® en tiempo real en los que uno de los dNTP naturales (que se utilizan en la FIGURA 6A) se sustituyó completamente con 5'-trifosfato de 5-bromo-2'-desoxirribouridina (d(5-BrU)TP, FIGURA 6B); 5'-trifosfato de 5-propinil-2'-desoxirribouridina (d(5-PrU)TP, FIGURA 6C) y 5'-trifosfato de 5-metil-2'-desoxirribo-citidina (d(5-MeC)TP, FIGURA 6D), respectivamente. La FIGURA 6A es idéntica a la FIGURA 5A, y se muestra aquí para facilitar la comparación directa. Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan® no se modificaron. Otras composiciones de la reacción de PCR, concentraciones de componentes y perfiles de temperatura/tiempo eran los mismos que se describen en los experimentos ejemplares que se muestran en la FIGURA 5.

Las FIGURAS 7A-7D muestran los resultados del control de fluorescencia en tiempo real en ensayos TaqMan® ejemplares a temperaturas de hibridación variables (que se muestran en °C para cada curva). La FIGURA 7B muestra las curvas de fluorescencia en la reacción de PCR cuando se sustituían completamente dos dNTP naturales (dATP y dTTP) con sus análogos respectivos con bases modificadas d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP. Los resultados de la FIGURA 7A son idénticos a los que se muestran en la FIGURA 5A. Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan® no se modificaron. Otras composiciones de la reacción de PCR, concentración de componentes y perfiles de temperatura/tiempo eran los mismos descritos para los experimentos ejemplares de la FIGURA 5. Los diagramas del panel de las FIGURAS 7C y 7D que se muestran debajo de las FIGURA 7A y 7B respectivamente, son los mismos resultados que se muestran en las FIGURAS 7A y 7B, pero se grafican a escala logarítmica. Los umbrales de la curva de fluorescencia ("C_t") se muestran con flechas y se determinaron como el número de ciclos al que las curvas logarítmicas (i) apuntaban a, o (ii) interceptaban el eje X.

Las FIGURA 8A y 8B muestran las curvas de fluorescencia en tiempo real. La FIGURA 8A muestra las curvas de fluorescencia en tiempo real combinadas que se obtienen del mismo ensayo TaqMan® y composición de reacción utilizada en los experimentos de la FIGURA 7B, sin embargo, el perfil de la PCR era diferente; a saber, (95 ° 2') → (9X ° YY" → 67 ° 45")₅₅. En este caso, la temperatura de hibridación era constante (67 °C), y las condiciones de desnaturalización variaban de temperatura (X = 95-97 °C) y tiempo (YY = 10 o 15 segundos) como se indica en cada curva. Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan® no se modificaron. Otras composiciones de reacción de PCR y concentraciones de componentes eran las mismas que las descritas en la FIGURA 5. La FIGURA 8B (a la derecha) muestra los mismos experimentos que en la FIGURA 8A, pero la fluorescencia se grafica en escala logarítmica. Los umbrales de la curva de fluorescencia ("C_t") se muestran mediante flechas para las curvas de 95 ° 10" y 97 ° 15".

La FIGURA 9 muestra la actuación de los ensayos TaqMan® que se muestran en las FIGURAS 5, 6 y 7, frente a la temperatura de hibridación de la PCR. La fluorescencia de cada reacción individual en el ciclo 50 de PCR se graficó frente a la temperatura de hibridación utilizada en esa reacción. En los casos en los que se sustituyeron dos dNTP naturales con d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP, los datos de fluorescencia se tomaron en el ciclo 54 debido al "retraso" de 4 ciclos en el valor de C_t observado en ese ensayo (FIGURA 7). Las flechas apuntan a las temperaturas de hibridación a las que se alcanzaba aproximadamente la mitad de la señal de ensayo (300 unidades de fluorescencia).

Las FIGURAS 10A-10C muestran los resultados de control de la fluorescencia que se obtienen con los ensayos de detección Scorpion. Las estructuras del oligonucleótido diana, los cebadores directo y Scorpion de la PCR que se utilizaron son los que se muestran en la FIGURA 4. Las concentraciones finales de los componentes de las mezclas de reacción (25 ml) al inicio de la PCR: cebadores directo y Scorpion de la PCR – 200 nM; oligonucleótido diana - 10.000 copias por reacción; dNTP – 200 mM de cada; ADN polimerasa JUMP START™ (Sigma) – 0,04 U/ml en 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Se restó la fluorescencia de fondo. Se utilizó un perfil de PCR (95 ° 2') → (95 ° 10" → X ° 45")₅₅ con la temperatura X que variaba de 61 a 75 °C.

La FIGURA 10A muestra un conjunto de experimentos ejemplares en los que se empleaba el sistema de detección Scorpion con todos los dNTP naturales. La FIGURA 10B muestra los resultados experimentales que eran análogos a la FIGURA 10A, pero el dATP natural se sustituyó completamente con un análogo con bases modificadas d(2-amA)TP. La FIGURA 10C muestra un conjunto de experimentos que también son análogos a la FIGURA 10A, pero en este caso dos dNTP naturales, en particular dATP y dTTP se sustituyeron completamente con los análogos con bases modificadas respectivos d(2-amA)TP y d(5-PrU)TP. Para asegurar la estabilidad de los valores de C_t, se utilizó un perfil de PCR ligeramente diferente (95 ° 2') → (97 ° 15" → X ° 45")₅₅ en el conjunto de experimentos de la FIGURA 10C.

La FIGURA 11 muestra la actuación de la señal de los ensayos Scorpion de las FIGURAS 10 frente a la temperatura de hibridación de PCR. La fluorescencia de cada reacción individual en el ciclo 50 de la PCR se graficó contra la temperatura de hibridación utilizada en esa reacción. Las flechas apuntan las temperaturas de hibridación a las que se alcanzaba aproximadamente la mitad de la señal del ensayo (150 unidades de fluorescencia).

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, la PCR de detección se lleva a cabo en dos estadios, (i) desnaturalización de la cadena y (ii) estadio de hibridación/extensión (combinados). El número de ciclos de PCR necesarios para proporcionar una concentración de ácido nucleico diana detectable depende de la carga de ácido nucleico diana inicial que comúnmente se desconoce. Como se utiliza en el presente documento, el perfil de tiempo/temperatura de la Pr se puede registrar en el presente documento, por ejemplo, como (95 ° 2') → (95 ° 10" → X ° 45")₅₅. Esto significa que antes de los ciclos regulares de la PCR la mezcla de reacción se incubó a 95 ° durante 3 minutos (activación de polimerasa) y luego se llevaron a cabo 55 ciclos en los que se desnaturalizó un amplicón de ADN a 95 ° durante 10 segundos seguido por una incubación a X° durante 45 segundos (PCR de dos etapas). X es una temperatura de hibridación/extensión combinadas que habitualmente es por encima de 50 °C, preferentemente por encima de 55 °C, preferentemente por encima de 60 °C, más preferentemente por encima de 65 °C e incluso preferentemente por encima de 70 °C.

Las directrices para llevar a cabo las reacciones de PCR se encuentran, por ejemplo, en Clementi M. y col (1993) PCR Methods Appl., 2: 191-196; Clegg R.M. (1992) Methods Enzymol., 211:353-388; Clementi M. y col (1993) PCR Methods Appl., 2: 191-196; Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) Curr. Opin. Biotech., 9: 43-48; Livak K.J. y col (1995) PCR Methods and Applications, 4: 357-362; McPherson M.J. y col, eds. (1991) PCR: A Practical Approach. IRL Press, Oxford; McPherson M.J. y col, eds. (1995) PCR2: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, y otros muchos manuscritos a los que se hace referencia en el presente documento.

II. Detección de los ácidos nucleicos de interés

Tecnologías de detección de ADN. El ADN modificado de la invención se puede detectar por cualquier medio físico o químico incluyendo, pero sin limitarse a una fuerza eléctrica (por ejemplo, electroforesis), Gravedad (por ejemplo, sedimentación), espectroscopia (por ejemplo, radio espectrometría, UV, espectroscopia de masas, fluorescencia, quimioluminiscencia, quimiofluorescencia, etc.), absorción, magnetismo, cromatografía (HPLC, fase inversa, intercambio iónico, exclusión por volumen, etc.), reacciones con proteínas (restringasas, endonucleasas, polimerasas, cinasas y otras actividades enzimáticas), afinidad de unión y similares. En ciertas realizaciones el ADN modificado se marca durante o poco después del estadio de amplificación y el marcador se utiliza en la detección de los ADN modificados. Los marcadores útiles incluyen, pero no se limitan a isótopos, radiomarcadores tales como ³²P, restos de unión tales como biotina, marcadores luminogénicos y de masa, restos fosforescentes o fluorescentes, colorantes fluorescentes solos o en combinación con otros colorantes o restos que pueden suprimir o cambiar la emisión de un espectro por efecto FRET. En otras realizaciones, los ADN modificados de la invención pueden detectarse utilizando un agente de detección durante la reacción de amplificación (en tiempo real) o después. Los agentes de detección preferidos son colorantes intercaladores y agentes fluorescentes, por ejemplo, bromuro de etidio. Por ejemplo, los productos de la amplificación de la PCR se pueden detectar utilizando colorantes intercaladores descritos por Wittwer C.T. y col en las Patentes de EE. UU. 6.174.670 y 6.569.627 y en Higuchi R. y col (1992) Biotechnology, 10:413-417; Higuchi R. y col (1993) Biotechnology, 11:1026-1030. Los agentes fluorescentes preferidos son las moléculas que cambian sus propiedades fluorescentes al interactúan con ácidos nucleicos que proporcionan una señal detectable. El SYBR Green I y II de Invitrogen son ejemplos de los agentes fluorescentes descritos en Schneeberger C. y col (1995) PCR Methods Appl., 4: 234-238 y Mackay J., Landt O. (2007) Methods Mol. Biol., 353: 237-262.

Oligonucleótidos sonda. En una realización, se detecta un ADN modificado de la invención utilizando un oligonucleótido sonda. El oligonucleótido sonda de la invención interactúa con el ADN modificado de una manera específica de secuencia formando un complejo (por ejemplo, un dúplex complementario) y este complejo es más

estable gracias al ADN modificado de la invención que tiene propiedades de hibridación mejoradas en comparación con las estrategias convencionales en las que el ADN no se modifica con análogos de bases estabilizantes del dúplex. En general, la estabilidad del complejo determina la sensibilidad de la detección. La estabilización del complejo entre el oligonucleótido sonda y el ADN modificado puede beneficiar el ensayo de detección en una variedad de formas como se ha expuesto en el presente documento anteriormente.

En otra realización, el oligonucleótido sonda incorpora un marcador en el que este marcador se utiliza en la detección del ADN modificado de la invención. En una realización preferida, este marcador es un marcador fluorescente y se utiliza para la detección del ADN modificado mediante una técnica de polarización de fluorescencia. En una realización más preferida, el oligonucleótido sonda es una sonda FRET. La aplicación de sondas FRET en la detección de ADN modificados proporciona ventajas críticas en la realización del ensayo de detección en tiempo real y la medición de la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. Cuando la reacción de amplificación es la PCR, este tipo de ensayo se denomina "PCR cuantitativa". La sonda FRET contiene dos cromóforos. El cromóforo "receptor" puede ser un colorante no fluorescente escogido porque inactiva la fluorescencia del fluoróforo "indicador" (Eftink M.R. (1991) En Lakowicz J.R. (ed.), Topics in Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, V.2:53-126). La formación de híbridos específicos de secuencia entre el ácido nucleico diana y las sondas da lugar a un cambio en las propiedades fluorescentes de la sonda proporcionando la detección del ácido nucleico diana. Los ensayos FRET en tiempo real son bien adecuados, en particular, para el diagnóstico clínico. Un factor importante para señalar aquí es que, a diferencia de los colorantes intercaladores y los agentes fluorescentes (por ejemplo, el bromuro de etidio, SYBR Green) que se exponen anteriormente, la detección es específica de secuencia, eliminando virtualmente los resultados falsos positivos. Muchos diseños de detección que exploran el efecto FRET se han publicado hasta la fecha.

Una primera estrategia FRET es una estrategia de *sonda FRET desencadenada por hibridación*, que se basa en el cambio de distancia entre los colorantes donante y receptor como resultado de la formación de un complejo específico de secuencia entre un ácido nucleico diana y un oligonucleótido sonda fluorescente. Por ejemplo, el procedimiento de Sonda de hibridación adyacente utiliza dos oligonucleótidos sonda que se hibridan con secuencias de ADN diana como se describe, por ejemplo, en Eftink M.R. (1991) En Lakowicz J.R. (ed.), Topics in Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, V.2:53-126; Heller M.J. y Morrison L.E. (1985) En Kingsbury, D.T. y Falkow, S. (eds.), Rapid Detection and Identification of Infectious Agents. Academic Press, New York, 245-256; Cardullo R.A. y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8790-8794. Cada una de las sondas se marca con un par de colorantes FRET en los extremos apropiados de la sonda de manera que cuando se hibridan ambas sondas a un ADN diana los fluoróforos donante y receptor se ponen en una proximidad espacial suficiente para proporcionar un FRET detectable.

Una estrategia alternativa son las sondas de auto-inactivación de fluorescencia como se describe en Livak K.J. y col, Patente de EE. UU. N.º 5.723.591. Estas sondas incluyen el indicador fluorescente y restos interruptores conjugados en los extremos opuestos de la misma sonda. Debido al enrollamiento aleatorio de oligonucleótido, el resto interruptor se acerca suficientemente al colorante indicador para inactivar su fluorescencia. Una vez que la sonda se hibrida a un polinucleótido diana complementario, se separan los restos interruptor e indicador, haciendo posible de esta manera el colorante indicador tenga fluorescencia. La estrategia de la sonda de auto-inactivación de fluorescencia tiene una aplicación limitada debido a una ineficacia profunda del efecto FRET en la sonda sin hibridar, que a su vez da lugar a un fondo fluorescente elevado. El problema del fondo se puede resolver sintetizando el oligonucleótido con un armazón PNA flexible, por ejemplo, Ortiz E. y col (1998) Mol. Cell. Probes, 12: 219-226.

De manera alternativa, se consigue un FRET eficaz utilizando Balizas moleculares, oligonucleótidos sonda con forma de horquilla en los que los colorantes FRET se ponen en estrecha proximidad por la formación de un tallo intramolecular, por ejemplo, Tyagi S. y Kramer F.R. (1996) Nat. Biotechnol., 14: 303-308; Bonnet G. y col (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 6171-6176; Tyagi S. y col (2000) Nat. Biotechnol., 18: 1191-1196; Marras S.A.E. y col (2002) Nucleic Acids Res., 30: e122. Los procedimientos de balizas moleculares son tecnologías preferidas en la práctica de la presente invención debido a su sorprendente bajo fondo de fluorescencia. Estas sondas están bien adaptadas para su uso en la PCR en tiempo real como se describe, por ejemplo, en Piatek A.S. y col (1998) Nat. Biotechnol., 16:359-363; Lewin S.R. y col (1999) J. Virol., 73: 6099-6103. Las balizas moleculares tienen un polimorfismo mejorado que discrimina las capacidades.

La unión covalente de una sonda fluorescente a uno de los cebadores de la PCR es una propiedad única de los cebadores Scorpion, por ejemplo, Whitcombe D. y col (1999) Nature Biotech., 17: 804-807; Thelwell N. y col (2000) Nucleic Acids Res., 28: 3752-3761. En los 'Scorpions', el extremo 5' de un cebador de PCR se conjuga con el extremo 3' de una baliza molecular mediante un engarce largo flexible. El engarce no es una matriz para la ADN polimerasa, por lo tanto, evitando la extensión sobre la secuencia de baliza. La parte genómica de la baliza molecular se diseña para unirse a un producto de extensión direccionado del cebador a la que la sonda se une covalentemente. A diferencia de las balizas moleculares, el estadio de detección de ADN en Scorpions se convierte en una reacción intramolecular. Esto ayuda a superar otro problema más de la tecnología Beacon asociada con la baja cinética de la hibridación.

Las *sondas Eclipse* son otro ejemplo de hibridación basada en sondas FRET que tienen un bajo fondo de fluorescencia (Afonina I.A. y col (2002) BioTechniques, 32: 940-949). El diseño de la sonda Eclipse incluye un resto

de unión de agrupamiento menor (MGB) en el extremo 5' además de dos colorantes FRET, uno de los cuales es un conmutador no fluorescente u oscuro. Debido al fuerte efecto estabilizante del dúplex del resto MGB como se expone en Kutayavin I.V. y col (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3718-3723, las sondas se pueden diseñar para que sean tan cortas como 12-20 méricas y siguen manteniendo las propiedades de hibridación necesarias para la PCR de detección en tiempo real. Colocando la cola MGB en el extremo 5' de las sondas se bloquea completamente la escisión de la nucleasa 5' y la señal fluorescente se genera solamente debido a la separación de colorantes desencadenada por la hibridación. El fondo de fluorescencia es bajo y las sondas Elipse discriminan fácilmente los SNP.

El mecanismo de la disrupción de FRET distanciando los colorantes FRET posee ciertos límites. Es difícil, por ejemplo, anular completamente el efecto FRET, y las sondas tienen que ser al menos 20-24 méricas. En los dúplex sonda diana cortas de 8-12 pb, la inactivación "residual" puede alcanzar como mucho el 20-50 % (Cardullo R.A. y col (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8790-8794). Además, el colorante indicador puede inactivarse parcialmente por las bases vecinas, en particular, por las guaninas independientemente del poco solapamiento espectral. Este efecto se conoce bien y se ha utilizado en la tecnología de detección de ADN conocida por el nombre de cebadores fluorogénicos auto-inactivados o también cebadores LUX (abreviatura de LUZ al eXtenderse), por ejemplo, Nazarenko I. y col (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30: e37; Nazarenko I. y col (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30: 2089-2195. La tecnología se lleva a cabo mejor con colorantes "verdes" como la fluoresceína (FAM). Sin embargo, los cebadores LUX no son específicos de la secuencia. Cualquier producto de la extensión del cebador LUX, incluyendo los cebadores diméricos, generarán una señal fluorescente.

Sondas FRET escindibles. La mejor estrategia para anular el FRET se basa en la escisión de los oligonucleótidos sonda al unirse a los ácidos nucleicos diana. La tecnología TaqMan™ se desarrolló como un procedimiento de detección de ácido nucleico en tiempo real y utiliza la actividad de la exonucleasa 5'-3' de la *Thermus aquaticus* (Taq) polimerasa, por ejemplo, Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) *Curr. Opin. Biotech.*, 9:43-48. Se diseña una sonda FRET marcada doblemente para hibridarse a una secuencia diana localizada entre dos sitios de unión del cebador de PCR. Durante la elongación de la cadena, la Taq polimerasa escinde la sonda que se hibrida corriente abajo a partir de un sitio de cebador liberando el colorante indicador a partir del interruptor alterando permanente e irreversiblemente el FRET, por ejemplo, Livak K.J. y col (1995) *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362. Los procedimientos basados en una sonda TaqMan™ son algunas de las tecnologías más preferidas para practicar aspectos de la presente invención. La escisión de la sonda TaqMan™ es irreversible y la señal generada en un ciclo de PCR determinado es una suma de señales generados en ese ciclo particular más todos los previos. Sin embargo, el elevado fondo de fluorescencia de las sondas TaqMan™ "clásicas" ensombrecen esta ventaja. La conjugación con un reto MGB en el extremo 3' da lugar a una mejora significativa de este parámetro (Kutayavin I.V. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:655-661). Las sondas TaqMan™-MGB 12-18 méricas relativamente cortas tienen propiedades de discriminación de SNP mejoradas. Sin embargo, la tecnología TaqMan™ sigue fuertemente unida a la actuación de la PCR mientras que las tecnologías de Sonda cíclica (CPT) son relativamente independientes.

Tecnologías de sonda cíclica (CPT). Las tecnologías de sonda cíclica (CPT) también son sistemas preferidos de detección para la práctica de los procedimientos de la invención. Estas reacciones se basan en una escisión continua de oligonucleótidos sonda que se unen a un ácido nucleico diana de una manera específica de secuencia. Una endonucleasa apropiada reconoce en complejo y escinde la sonda mientras que deja la cadena diana intacta reciclandose para la próxima ronda de escisión. Si la sonda hibridada se escinde internamente, los productos de escisión forman híbridos más débiles que la sonda original y estos fragmentos de sonda se disocian de la cadena diana dejándola disponible para rondas adicionales de la reacción de escisión. El reciclado de la diana significa que se puede escindir más de una sonda por molécula diana. A diferencia de todas las otras tecnologías a las que se hace referencia anteriormente, incluyendo TaqMan™, en las reacciones CPT la señal es una función de dos variables principales, la concentración de diana y el tiempo. Cuando la concentración de diana es fija, la señal crece linealmente con el tiempo. Reflejando el progreso de la reacción, la escisión se ralentiza y eventualmente se para cuando todas las sondas CPT se escinden. Se han publicado varios diseños del sistema. La primera estrategia se basa en el uso de sondas químicas de ADN-ARN que se escinden por la RNasa H al unirse al ADN diana, como se describe en Fong W. y col (2000) *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2525-2529; Modruzan Z. y col (2000) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 37: 45-50. Estas sondas ADN se diseñan para tener al menos 4-5 ribonucleótidos en la mitad de la cadena de oligonucleótido. La RNasa H escinde solo la parte de ARN de la sonda hibridada y el polinucleótido diana se recicla para hibridarse a otra molécula de sonda sin escindir. En condiciones apropiadas, esto da lugar a un ciclado de la reacción de escisión de la sonda. El reciente descubrimiento y aislamiento de análogos termoestables de la RNasa H han permitido combinar esta tecnología de detección de ADN con una PCR como se demuestra, por ejemplo, en Harvey J.J. y col (2004) *Anal. Biochem.*, 333: 246-255. Las sondas FRET respectivas se pueden obtener en Takara Bio.

La segunda estrategia CPT se basa en la especificidad de sustrato de la Endonucleasa IV de *E. coli*, una endonucleasa AP que inicia la reparación de sitios abásicos y otras lesiones relacionadas con el ADN. Una sonda FRET y un amplificador pueden formar colectivamente un sustrato para la endonucleasa AP que simula un sitio abásico parcialmente degradado. La enzima reconoce en este sustrato artificial y "corta" la cola 3' de la sonda liberando de esta manera el colorante indicador y alterando el FRET. Esta reacción se puede llevar a cabo en un modo cíclico en el que se consigue un alto rendimiento de sonda escindida en concentraciones de ADN diana nanomolares o incluso sub-nanomolares como se describe en Kutayavin I.V. y col (2004) *Solicitud de Patente de EE.*

UU. N.º 20040101893.

Tercero, y quizá, la tecnología de sonda cíclica más avanzada en el mercado es el *ensayo de detección INVADER™*. Utiliza la actividad de flap o 5'-endonucleasa de ciertas polimerasas para escindir dos oligonucleótidos parcialmente solapados al unirse al ADN diana. El ensayo INVADER™ normalmente consiste en dos reacciones de escisión cíclica consecutivas. La enzima utilizada para proporcionar la reacción de escisión es la CLEAVASE, una ADN polimerasa con capacidades sintéticas sustancialmente reducidas o completamente eliminadas, por ejemplo, Dahlberg J.E. y col (1997) Patente de EE. UU. 5.691.142; Dahlberg J.E. y col (1998) Patente de EE. UU. 5.837.450; Brow M.A.D. y col (1998) Patente de EE. UU. 5.846.717; Prudent J.R. y col (1999) Patente de EE. UU. 5.985.557; Hall J.G. y col (1999) Patente de EE. UU. 5.994.069; Brow M.A.D. y col (1999) Patente de EE. UU. 6.001.567; Prudent J.R. y col (2000) Patente de EE. UU. 6.090.543; Prudent J.R. y col (2002) Patente de EE. UU. 6.348.314; Prudent J.R. y col (2005) Patente de EE. UU. 6.875.572; Aizenstein B.D. y col (2005) Patente de EE. UU. 6.913.881; Schweitzer B. y Kingsmore S. (2001) Curr. Opin. Biotech., 12: 21-27. El sistema de detección es un ensayo de amplificación de señal eficaz que no necesita una amplificación anterior del ADN diana. Sin embargo, antes de la amplificación de ácidos nucleicos es una estrategia preferida en la aplicación del ensayo INVADER. El primer problema es la fluorescencia de fondo que aumenta linealmente con el tiempo. Se genera por una escisión no específica del casete de la sonda. Además, el ensayo necesita una carga de ADN diana sustancial, por ejemplo, Schweitzer B. y Kingsmore S. (2001) Curr. Opin. Biotech., 12: 21-27, cuando no se aplica la amplificación. Las combinaciones de CPT con técnicas de amplificación proporcionan ventajas críticas como se describe para los oligonucleótidos sonda con estructuras secundarias en Sorge J.A. (2001) Patente de EE. UU. N.º 6.589.743.

Las tecnologías de detección de ácidos nucleicos citados y descritos anteriormente representan una fracción ejemplar de las innovaciones y procedimientos en este campo de la técnica. Hay muchas otras técnicas que se basan en el uso de oligonucleótidos sonda y, en particular, las sondas FRET. Todas las tecnologías que se basan en la hibridación de un oligonucleótido sonda con un ácido nucleico diana beneficiaría el uso de la presente invención. Las directrices detalladas para llevar a cabo una reacción de detección particular incluyen las reglas de diseño del oligonucleótido cebador y la sonda, composición preferida de las mezclas de reacción, condiciones de reacción, características de los ensayos y su aplicabilidad y limitaciones, y otra información importante para llevar a cabo las reacciones de detección se pueden encontrar en los manuscritos y patentes citados anteriormente.

III. Componentes del ensayo de detección

ADN polimerasas. Las ADN polimerasas son componentes clave en la práctica de los ensayos de ácido nucleico de la presente invención. Las ADN polimerasas útiles de acuerdo con la invención incluyen tanto polimerasas nativas, así como polimerasas mutantes, que carecen de actividad exonucleasa 5' a 3' y/o 3' a 5'. Las polimerasas de ácido nucleico pueden poseer diferentes grados de termoestabilidad. La elección de ADN polimerasa se determina mediante muchos factores que se refieren habitualmente a la elección de las reacciones de amplificación y detección aplicadas en la invención. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa presenta preferentemente una actividad de desplazamiento de cadena a la temperatura a la que se puede extender el oligonucleótido cebador. En muchos casos de amplificación isotérmica en la que se basa la amplificación de ADN en el desplazamiento de una de las cadenas de ADN, por ejemplo, en las amplificaciones SDA y de círculo rotativo, la ADN polimerasa carece preferentemente de actividad exonucleasa 5' a 3'. Las ADN polimerasas de la invención se pueden aislar de distintas fuentes naturales incluyendo enzimas de bacteriófagos, arqueas, eubacterias y eucariotas.

Las enzimas disponibles en el mercado que carecen de ambas actividades de exonucleasa 5' a 3' y 3' a 5' incluyen Sequenase (exo-T7; USB), Pfu exo- (Stratagene), Bst (Bio-Rad), Isotherm (Epicentre), fragmento Stoffel (Perkin-Elmer), ThermoSequenase (USB), y TaqFS (Hoffman-LaRoche). Ejemplos de ADN polimerasa termoestable que son útiles para los ensayos de PCR de detección incluye, pero no se limita a Pfu, Taq, Vent, Deep Vent y UITma ADN polimerasas y otras polimerasas de la especie *Thermus* o de *Thermotoga maritima*. Las polimerasas termoestables para la PCR de detección remontan su actividad a una temperatura >90 °C y más preferentemente >100 °C. Ciertas reacciones de detección, por ejemplo, los ensayos TaqMan, necesitan el uso de ADN polimerasa que expresan actividad exonucleasa 5' a 3'. Se utilizó la ADN polimerasa JumpStart de Sigma en los Ejemplos proporcionados en el presente documento.

5'-fosfatos de desoxinucleósidos estabilizantes del dúplex con bases modificadas (dNTP). Los ADN modificados con propiedades de hibridación mejoradas de la presente invención se amplificaron en una reacción de extensión de oligonucleótidos cebadores dependientes de la matriz en presencia de ADN polimerasa en una mezcla de dNTP que comprende al menos uno o preferentemente más de uno 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos estabilizantes del dúplex con bases modificadas. Ejemplos de los análogos de dNTP útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los que se muestran en la FIGURA 3. La reacción de amplificación de la invención normalmente incluye los cuatro dNTP (dTTP, dCTP, dATP y dGTP) en el que uno o más de los dNTP naturales se sustituye parcial o completamente con un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas. Los desoxinucleósidos estabilizantes del dúplex con bases modificadas de la presente invención contienen 2-desoxi-D-ribosa en el que la base del nucleótido está modificada. Estos análogos de nucleósido se pueden sintetizar aplicando técnicas bien conocidas de química orgánica que se ejemplifican, por ejemplo, en Townsend L.B., ed. (1988) Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, NY. Los 5'-trifosfatos respectivos se pueden obtener utilizando los protocolos descritos, por ejemplo, en Vaghefi M., ed. (2005) Nucleoside Triphosphates and

their Analogs: Chemistry, Biochemistry, and Biological Applications, Taylor & Francis. Los desoxinucleósidos estabilizantes del dúplex con bases modificadas de la presente invención, incluyen muchas de las que se muestran en la FIGURA 3, se pueden obtener a partir de fuentes comerciales, por ejemplo, en Trilink (California, USA).

Como es necesario para ciertos esquemas de amplificación, la mezcla de reacción de la invención también puede incorporar análogos de dNTP distintos de los estabilizantes de dúplex con bases modificadas. Por ejemplo, la amplificación SDA descrita en Walker G.T. y col. (1993), Patente de EE. UU. 5.270.184 necesita el uso de un análogo α -tio dNTP para promover la mella de una cadena de ADN de doble cadena. El 5'-trifosfato desoxiuridina es otro ejemplo más. Aunque se sabe que esta modificación de base desestabiliza los dúplex de ADN, el uso de dichos ADN modificados sigue estando en el ámbito de la presente invención. El fin principal de la aplicación de dUTP es la prevención del traspaso de contaminación de muestra a muestra como se describe en Gelfand D.H. y col (1995) Patente de EE. UU. 5.418.149.

Dependiendo de la elección de la reacción de amplificación de ADN, los componentes de reacción de la invención pueden variar. Además de los componentes principales, las mezclas de reacción de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, agentes de detección, enzimas especializadas (por ejemplo, transcriptasas inversas, nucleasas, nucleasas, FEN endonucleasas, endonucleasas de restricción, RNasas, incluyendo RNasa H, ARN polimerasas, helicasas, etc.), agentes tampón para mantener el pH en un nivel seleccionado durante una reacción, sales, co-factores y aditivos, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona, glicerol, poli(etilenglicol), dimetil sulfóxido (DMSO) o formamida y similares.

Oligonucleótidos cebadores y sondas. Los oligonucleótidos cebadores inician la síntesis y amplificación de ADN modificados en todas las reacciones de amplificación de la presente invención. Los oligonucleótidos cebadores pueden ser de origen natural, como en una digestión por restricción y se pueden producir sintéticamente. Los oligonucleótidos cebadores de la invención deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con una cadena de la matriz para la elongación del cebador que se produce en presencia de una ADN polimerasa. La secuencia de los oligonucleótidos cebadores no tiene que reflejar la secuencia exacta de los ácidos nucleicos diana para cuya hibridación se han diseñado. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario se puede unir en el extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementario a la cadena. Las bases no complementarias o más largas pueden intercalarse en el cebador, a condición de que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la matriz con la que se hibrida y formar de esta manera un complejo matriz-cebador para la síntesis del producto de extensión del oligonucleótido cebador. El diseño del cebador está dirigido por una reacción de amplificación particular. Por ejemplo, los cebadores diseñados para la amplificación SDA incorporan una secuencia de una endonucleasa de restricción que apoya la reacción de amplificación, por ejemplo, Walker G.T. y col, Patente de EE. UU. 5.270.184; Dattagupta N. y col, Patente de EE. UU. 6.214.587; Walker G.T. y col (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24, 384-353 Walker G.T. y col (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392 - 396; Spargo C.A. y col (1996) *Molecular and Cellular Probes*, 10 247-256.

Los oligonucleótidos cebadores sintéticos útiles para la invención pueden contener modificaciones estructurales tales como átomos, restos, residuos, polímeros, engarces que son habitualmente de naturaleza sintética y que no están presentes comúnmente en ácidos nucleicos naturales. Los oligonucleótidos cebadores pueden incorporar un marcador detectable, por ejemplo, isótopos, radiomarcadores tales como ^{32}P , restos de unión tales como biotina, haptenos tales como dioxigenina, luminogénicos, marcadores de masa, restos fosforescentes o fluorescentes, colorantes fluorescentes y similares. Como los cebadores se incorporan habitualmente durante la amplificación de ADN, se puede utilizar el marcador para detectar los ADN modificados de la presente invención. Los oligonucleótidos cebadores también pueden incorporar análogos de nucleósidos o nucleótidos que están presentes raramente en los ácidos nucleicos naturales incluyendo, pero no limitados a inosina (hipoxantina), 5-bromouracilo, 5-metilcitosina, 5-yodouracilo, 2-aminoadenosina, 6-metiladenosina, pseudouridina y similares. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos cebadores incorporan modificaciones estructurales que proporcionan un efecto de estabilización de dúplex. Sin embargo, en todos los aspectos de la invención, el extremo 3' de los cebadores no deben bloquearse para iniciar la síntesis de ADN. Los ejemplos de las modificaciones estructurales preferidas que se pueden utilizar en el diseño de oligonucleótidos cebadores pero no se limitan a engarces de agrupamiento menor (MGB) (Afonina I. y col (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 2657-2660) que habitualmente se acoplan en el extremo 5' y ciertos análogos de nucleótidos, aunque el número de estas modificaciones pueden estar limitadas. Ejemplos de análogos de nucleótidos incluyen bases "universales" (Burgner D. y col (2004) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23: 755-765) y "ácidos nucleicos bloqueados" ("LNA") (Latorra D. y col (2003) *Mol. Cell. Probes*, 17: 253-259; Latorra D. y col (2003) *Hum. Mutat.*, 22:79-85; Di Giusto D.A. y King G.C. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32: e32). Varios análogos de nucleótido con bases modificadas se toleran bien por las ADN polimerasas y estos análogos se pueden utilizar en el diseño de cebadores. Ejemplos de dichos análogos de nucleótido con bases modificadas incluyen, pero no se limitan a 5-metil citosina y 2,6-diaminopurina (Lebedev Y. y col (1996) *Genet. Anal.*, 13, 15-21).

Los oligonucleótidos cebadores de acuerdo con la invención se pueden marcar y se pueden utilizar para amplificar un ADN modificado marcado. El marcador se utiliza en el estadio de detección de ácido nucleico. Un marcador preferido es un marcador fluorescente. En un aspecto, u oligonucleótido cebador se puede acoplar con un oligonucleótido sonda, por ejemplo, el cebador Scorpion (Whitcombe D. y col (1999) *Nature Biotech.*, 17:804-807; Thelwell N. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:3752-3761).

Sondas. Los oligonucleótidos sonda de acuerdo con la invención son oligómeros o polímeros capaces de formar estructuras dúplex u otros complejos con productos de amplificación de la invención, los ADN modificados, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en las sondas con respectivas secuencias en los ADN modificados. Los oligonucleótidos sonda de la presente invención se pueden modificar o contener modificaciones estructurales. Ciertas modificaciones están presentes comúnmente en los oligonucleótidos sonda y habitualmente se refieren a marcadores utilizados en la detección de ADN modificados de la invención. Los oligonucleótidos marcados por fluorescencia y, en particular, las sondas FRET son componentes de detección preferidos de la invención. Cuando los oligonucleótidos sonda y los cebadores se hibridan a un ADN modificado de la invención, se forman complejos complementarios estabilizados debido a que los ADN modificados de la invención expresan propiedades de hibridación mejoradas en comparación con las estrategias convencionales en las que el ADN no está modificado con análogos de bases estabilizantes del dúplex. A diferencia de los oligonucleótidos cebadores, los oligonucleótidos sonda tienen pocos límites de uso de las modificaciones estructurales. Esto es especialmente cierto para las tecnologías de sonda FRET desencadenada por la hibridación. Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, los oligonucleótidos sonda pueden producirse completamente de monómeros PNA no naturales, por ejemplo, Ortiz E. y col (1998) *Mol. Cell. Probes*, 12:219-226. El uso de otros análogos de nucleótidos con las bases modificadas o el azúcar modificado en el diseño de sondas como el LNA también son aplicables ampliamente (Johnson M.P. y col (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:e55; Simeonov A. y Nikiforov T.T. (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30:e91). Los oligonucleótidos sonda pueden tener un resto MGB conjugado en cualquier extremo. Por ejemplo, las sondas FRET conjugadas con MGB en 5' no se escinden en la PCR de detección y estas sondas proporcionan una señal debido a un mecanismo de acción desencadenado por la hibridación como se describe en Vermeulen N. y col (2002) *J. Clin. Ligand Assay*, 25: 268-275. Las sondas FRET con MGB conjugado en 3' no se bloquean por la degradación de nucleasa 5' y estas sondas generan una señal fluorescente al escindirse por polimerasa Taq como se ejemplifica en Kutayavin I.V. y col (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28:655-661. En esos casos, cuando se utiliza una estrategia de escisión de la sonda, se pueden aplicar los límites al uso de modificaciones estructurales, en particular, en la secuencia de los sitios de escisión.

Los oligonucleótidos cebadores y sondas se pueden sintetizar utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Aunque los cebadores se pueden preparar, por ejemplo, mediante clonación y análisis de digestión de restricción de las secuencias apropiadas, la síntesis química directa es una estrategia preferida. Los oligonucleótidos se pueden preparar por un procedimiento de síntesis química adecuado, que incluye, por ejemplo, el procedimiento de fosfodiéster desvelado en Brown E.L. y col (1979) *Methods Enzymol.*, 68: 109-151, el procedimiento de fosfotriéster descrito en Narang S.A. y col (1979) *Methods Enzymol.*, 68: 90-98. La estrategia preferida es el procedimiento de dietilfosforoamidato desvelado en Beaucage S. L., Caruthers M. H. (1981) *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862, en combinación con un procedimiento de soporte sólido desvelado en Caruthers M.H., Matteucci M.D. (1984) Patente de EE. UU. 4.458.066 y se lleva a cabo utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático comercial.

Cuando es necesario marcar los oligonucleótidos cebadores y sondas de la invención con un colorante fluorescente, se pueden aplicar un amplio intervalo de fluoróforos en los diseños y síntesis de sondas y cebadores. Los fluoróforos disponibles incluyen, pero no se limitan a cumarina, fluoresceína (FAM, habitualmente 6-fluoresceína o 6-FAM), tetraclorofluoresceína (TET), hexaclorofluoresceína (HEX), rodamina, tetrametilrodamina, BODIPY, Cy3, Cy5, Cy7, rojo Texas y ROX. Los fluoróforos se pueden escoger para que absorban y emitan en el espectro visible o fuera del espectro visible, tal como en los intervalos ultravioleta o infrarrojo. Las sondas FRET de la invención incorporan comúnmente un par de fluoróforos, uno de los cuales puede ser un cromóforo no fluorescente (al que se hace referencia comúnmente como "conmutador oscuro"). Los conmutadores oscuros adecuados descritos en la técnica incluyen particularmente Dabcilo y sus derivados como el Rojo de metilo. Los conmutadores no fluorescentes comerciales, por ejemplo, Eclipse (Glen Research) y BHQ1, BHQ2, BHQ3 (Biosearch Technologies), también se pueden utilizar para la síntesis de sondas FRET de la invención. Los conmutadores preferidos sean conmutadores oscuros o fluoróforos no tienen fluorescencia en el intervalo de detección escogido de un ensayo.

Los fluoróforos donante y receptor para la fabricación de componentes de oligonucleótidos marcados de la invención se pueden seleccionar de grupos fluorescentes adecuados, por ejemplo, 6-FAM (6-carboxifluoresceína); 6-hexacloro-fluoresceína ([4,7,2',4',5',7'-hexacloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)- ácido 5-carboxílico]); 6-tetracloro-fluoresceína ([4,7,2',7'-tetra-cloro-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil)-ácido 6-carboxílico]); 6-TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina; Dabcilo (4-((4-(dimetilamino) fenil) azo) ácido benzoico); Cy5 (Indodicarbocianina-5); Cy3 (Indodicarbocianina-3); y similares.

Los oligonucleótidos cebadores y sonda para la práctica de la invención se diseñan de acuerdo con reglas y especificaciones de una tecnología de detección o amplificación particular conocida en la técnica, incluyendo las técnicas expuestas y citadas anteriormente. Hay ciertas necesidades comunes para los componentes de oligonucleótido, por ejemplo, las propiedades de hibridación del oligonucleótido necesitan afrontar la temperatura de una reacción particular, habitualmente a la que se hace referencia como temperatura de fusión TM. La T_m define una temperatura a la que un complejo complementario de un componente de oligonucleótido con un ácido nucleico diana se disocia a la mitad en cadenas sencillas. Una estimación simple del valor de T_m se puede calcular utilizando la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G + C)$, cuando un ácido nucleico está en una solución acuosa con 1 M de NaCl. Los cálculos más precisos se pueden hacer utilizando la termodinámica de pares de bases de una estrategia de "vecinos más cercanos" (Breslauer K.J. y col (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3746-3750; SantaLucia J. Jr. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465). También se pueden utilizar programas comerciales que incluyen OligoTM,

Primer Design y programas disponibles en internet, incluyendo Primer3 y Olio Calculator para calcular una T_m de una secuencia de ácido nucleico útil de acuerdo con la invención. Los programas comerciales, por ejemplo, Visual OMP (software de ADN), Beacon designer 7.00 (Premier Biosoft International), pueden ser útiles en el diseño de ensayos del sistema de detección en tiempo real con SYBR Green, TaqMan y balizas moleculares para reacciones de amplificación NASBA basados en PCR. En general, los valores de T_m de los oligonucleótidos sonda son 5-7 °C mayores que los de la T_m correspondiente de amplificación de los cebadores.

Los parámetros de la termodinámica de vecinos más cercanos se determinaron solo para las bases naturales (véase, Breslauer K.J. y col (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3746-3750). Los valores análogos para análogos de nucleótidos modificados no están disponibles haciendo imposible una previsión con precisión de los valores de T_m para los oligonucleótidos cebadores modificados y la sonda de la invención. Sin embargo, se pueden hacer estimaciones a condición de que la sustitución de una desoxiadenosina por d(2-amA) (2,6-diaminopurina) y una timidina por 5-propinil uridina aumenta el valor de T_m de un oligonucleótido 20mérico tomado aleatoriamente unos 0,8-1 °C. Las mismas estimaciones se pueden utilizar cuando estos nucleótidos modificados se incorporan en una cadena de ADN modificado, aunque esto puede ser incluso menos preciso debido al aumento de predisposición de los polinucleótidos largos a formar estructuras secundarias (efecto de "enrollamiento"). Los valores de la T_m para los oligonucleótidos cebadores y sondas conjugados con MGB pueden evaluarse de acuerdo con las directrices de Kutyavin I.V. y col (1997) Nucleic Acids Res., 25 3718-3723. Las temperaturas de fusión de las sondas TaqMan MGB 3' se pueden prever utilizando un software comercial proporcionado por el fabricante (ABI, California, EE. UU.).

IV. Realización del ensayo de detección de la invención

Preparación de ácido nucleicos para la amplificación y detección. Unos aspectos particulares de la invención se refieren a procedimientos para la detección de ácidos nucleicos diana en la muestra de ensayo. La muestra puede ser una célula, tejido, fluido, plasma, suero, orina, lágrimas, heces, saliva, fragmentos de diferentes órganos, tejidos, células sanguíneas, y similares, materiales que contienen, habitualmente de naturaleza biológica, distintos de los ácidos nucleicos que se van a detectar. Antes de llevar a cabo los estadios de amplificación y detección, se necesita comúnmente que los ácidos nucleicos de interés se purifiquen y aislen de las muestras. Preferentemente, los ácidos nucleicos diana están suficientemente libres de proteínas y cualquier otra sustancia que interfiera en las reacciones de amplificación y detección. Están disponibles muchos procedimientos para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos diana incluyendo kits comerciales e instrumentos especializados. Por ejemplo, se pueden aislar los ácidos nucleicos utilizando una extracción orgánica con un reactivo orgánico fenol/cloroformo seguida por precipitación en etanol, procedimiento de adsorción en fase sólida y precipitación de ADN inducida por sales. Las directrices para llevar a cabo las técnicas de aislamiento de ácido nucleico se pueden encontrar en Ausubel y col., eds., (1993) Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1, Capítulo 2, Sección I, John Wiley & Sons, New York; Walsh y col. (1991) Biotechniques, 10:506-513, Boom y col., Patente de EE. UU. 5.234.809; Miller y col (1988) Nucleic Acids Res., 16:1215. Las cantidades de ácidos nucleicos de interés aislados de diferentes fuentes se limitan comúnmente para hacer posible la detección directa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos diana tienen que amplificarse utilizando un procedimiento de amplificación adecuado.

Amplificación y detección de ADN modificados. Los ácidos nucleicos purificados de interés se pueden amplificar y detectar mediante una combinación de las técnicas de amplificación y detección citadas y expuestas en el presente documento a condición de que, además de todos los reactivos necesarios para cualquier amplificación específica de elección, la reacción de amplificación comprenda al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas para producir múltiples copias de ADN modificados de la presente invención. En una realización, la detección del ácido nucleico diana se lleva a cabo después de la amplificación. En ciertos aspectos, estos dos estadios pueden estar completamente separadas en "tiempo y espacio" de manera que los componentes de la reacción de detección no están presentes en la mezcla de reacción durante la amplificación. Esto incluye el caso en el que la reacción de detección se lleva a cabo en un matraz de reacción o tubo distinto. En dichos casos, el ADN modificado de la reacción de amplificación (en cantidad completa o una fracción) se puede transferir a un matraz de reacción en el que se llevará a cabo la reacción de detección. De manera alternativa, los componentes de detección se pueden añadir al matraz de reacción después de completar la amplificación. El ADN modificado puede purificarse completa o parcialmente de los componentes de amplificación antes de añadirse a la reacción de detección, por ejemplo, utilizando una precipitación en alcohol o kits comerciales. En otra realización, todos o alguno de los componentes de la reacción de detección están presentes durante la reacción de amplificación, pero la detección no progresa, por ejemplo, debido a la temperatura de reacción que no soporta el estadio de detección. Cuando se completa esencialmente la amplificación del ácido nucleico, se desencadena la reacción de detección mediante el cambio de la temperatura de reacción. La estrategia de separación de la reacción permite combinar en un ensayo de detección del ácido nucleico a mayoría de las reacciones de amplificación y detección incluyendo, pero sin limitarse a los expuestos y referenciados en el presente documento. Unas excepciones pueden ser las reacciones de detección tipo TaqMan™ que se diseñan para una actuación en tiempo real. Sin embargo, esta estrategia complica las mediciones cuantitativas de ácido nucleico. Los ensayos de detección de ácido nucleico preferidos para practicar la invención son los ensayos de detección en tiempo real.

Los expertos habituales en la técnica apreciarán que hay ciertas consideraciones en la recopilación de las reacciones de amplificación y detección en tiempo real. En general, los sistemas de amplificación que se basan en desplazamiento de la cadena como SDA y círculo Rotativo puede ser menos compatible con las reacciones de

detección que necesitan el uso de una actividad exonucleasa como TaqMan y tecnologías Invader. Un ensayo en tiempo real se puede llevar a cabo utilizando un agente de detección como el bromuro de etidio o SYBR Green I. Sin embargo, esta estrategia elimina esencialmente la posibilidad de detectar múltiples ácidos nucleicos de interés (ensayo múltiple) y la reacción de detección no es específica de secuencia que no proporciona una discriminación entre productos de interés y amplificación errónea, por ejemplo, un cebador dimérico. Se han publicado ejemplos en los que la detección específica de secuencia de componentes (comúnmente con sondas FRET) no interfiere con la reacción. Por ejemplo, una sonda fluorescente llamada Cremallera molecular se combinaba eficazmente con la amplificación de círculo rotativo (Yi J. y col (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34:e81) y se combinaron varias tecnologías de detección con la amplificación NASBA (Niesters H.G. (2001) *Methods*, 25:419-429). La PCR es una reacción muy compatible y se han desarrollado muchos de los ensayos en tiempo real hasta la fecha basándose en este sistema de amplificación como esto se refleja en numerosas patentes y manuscritos citados en el presente documento. Los ejemplos proporcionados en el presente documento también ilustran la PCR de detección en tiempo real que emplean reacciones de detección con sonda FRET, tecnologías TaqMan y Scorpion.

En realizaciones preferidas, se amplifican y detectan más de un ácido nucleico diana en la misma mezcla de reacción (ensayo múltiple). Preferentemente, la detección de múltiples ácidos nucleicos se hace en tiempo real. Esto se puede conseguir cuando los componentes de detección tales como los oligonucleótidos sonda se marcan con diferentes restos que se pueden detectar independientemente. Cuando se utilizan las sondas FRET, esto se consigue por una selección de fluoróforos indicadores que emiten luz en diferentes partes del espectro.

V. Ejemplos

Los expertos habituados en la técnica se sorprenderán por el uso inventivo de dNTP estabilizantes del dúplex con bases modificadas en la amplificación y detección de ADN modificados de acuerdo con la invención. Con el fin de satisfacer los requisitos de los ensayos de detección de ácidos nucleicos, en particular, el tiempo de desafío y las restricciones de temperatura de la PCR de detección, las propiedades de sustrato de los dNTP modificados tienen que tener una estrecha coincidencia con los dNTP naturales. Está bien establecido en la técnica que los cambios estructurales en los dNTP normalmente continúan con cambios negativos en sus propiedades de sustrato con respecto a la interacción con la ADN polimerasa (véase, "ANTECEDENTES" en el presente documento). Por ejemplo, se pueden incorporar los dNTP menos eficazmente y esto puede enlentecer la amplificación hasta un grado que sea inaceptable para los ensayos de detección de ácidos nucleicos. Además, la ADN polimerasa, particularmente en la PCR, se enfrenta a las bases modificadas en dos ocasiones mutuamente diferentes (i) cuando se incorporan dNTP modificados en una cadena de ADN en crecimiento y (ii) cuando se incorporan sus equivalentes de Watson-Creek utilizando una matriz con bases modificadas producida en ciclos previos. De acuerdo con el estudio hecho por Sawai H. Y col (2002) *Bioconjug. Chem.*, 13: 309-316, la respuesta de una ADN polimerasa sobre las modificaciones de bases en estas dos ocasiones puede ser diferente. La estabilización preferente de los elementos de la estructura secundaria en el ADN modificado es otra razón de preocupación. Virtualmente cualquiera de los polinucleótidos tomados aleatoriamente, incluyendo el oligodesoxirribonucleótido 96-mérico diana que se utilizó como ácido nucleico diana en los Ejemplos de la invención, forma elementos de estructura secundaria, por ejemplo, bucles protuberantes, bucles internos, horquillas, estructuras en Y, bucles heterólogos, y similares debido a una complementariedad "accidental" de una secuencia del polinucleótido con otra secuencia más del mismo polinucleótido. En el ADN modificado de la invención, ambas cadenas del dúplex incorporan la modificación estabilizante del dúplex al contrario que el complejo formado entre un componente oligonucleotídico (cebador o sonda) y el ADN modificado en el que solo se modifica una cadena (en casos en los que el oligonucleótido no se modifica). Se ha demostrado que la progresión de varios tipos de ADN polimerasas, de procariotas, fagos y eucariotas se impide en ciertas secuencias de AD, que se prevé que se pliegan en estructuras secundarias, por ejemplo, LaDuca R.J. y col (1983) *Biochemistry*, 22: 5177-5188; Bedinger P. y col (1989) *J. Biol. Chem.*, 264: 16880-16886; Bierne H. y Michel B. (1994) *Mol. Microbiol.*, 13: 17-23. La estabilización de las estructuras secundarias en los ácidos nucleicos se culpó de los resultados negativos de dichas modificaciones de bases estabilizantes del dúplex observadas en la detección de ARN (Nguyen A. y col (2002) *BMC Biotechnology*, 2: 14; Hacia J.G. y col (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26: 4975-4982). Por lo tanto, los expertos en la técnica apreciarán la impredecibilidad, hasta la presente invención, de los efectos de cualquier dNTP modificado o combinación de los mismos sobre los ensayos de detección de ácidos nucleicos y, en particular, en la PCR de detección, debido a estas complejidades reconocidas en la técnica de las reacciones de amplificación y detección.

Sorprendentemente, sin embargo, los dNTP con bases modificadas de la presente invención se llevan a cabo extraordinariamente bien en la PCR de detección. Los experimentos que se muestran en las FIGURAS 5, 6 y 10 (expuesto en detalle en el presente documento) prueban que los dNTP con bases modificadas utilizados en estos ejemplos pueden sustituir completamente su 5' trifosfato de nucleósido natural respectivo sin ningún daño en el ensayo de PCR de detección. Los ensayos de detección en el que uno de los dNTP naturales se sustituía con d(2-amA)TP, d(5-MeC)TP, d(5-BrU)TP o d(5-PrU)TP presentaban esencialmente la misma señal fluorescente y valores de C_t idénticos. La estabilidad del punto de umbral (C_t) es particularmente importante. Cualquier efecto negativo del dNTP con bases modificadas sobre el proceso de amplificación daría lugar a la reducción del rendimiento de la PCR y se reflejaría adecuadamente en un aumento del umbral. Un ejemplo de este efecto se puede encontrar en la FIGURA 7B.

Todos los dNTP con bases modificadas proporcionan aparentemente amplicones de ADN modificados con

propiedades de hibridación mejoradas ya que la sustitución del dNTP respectivo permite el aumento de las temperaturas de PCR sin ninguna pérdida de la actuación del ensayo. Las FIGURAS 9 y 11 (expuestas en detalle en el presente documento) muestran un resumen de los experimentos llevados a cabo en las FIGURAS 5, 6 y 10 (expuestas en detalle en el presente documento), proporcionando una mejor representación del efecto de estabilización del sistema. La escala del efecto varía entre y respecto a los análogos de dNTP, aumentando de acuerdo con el siguiente orden $d(5\text{-BrU})TP = d(5\text{-PrU})TP < d(5\text{-MeC})TP < d(2\text{-amA})TP < d(5\text{-PrU})TP + d(2\text{-amA})TP$. Sin embargo, este orden puede no ser necesariamente un reflejo de la tendencia o relación absoluta entre las contribuciones termodinámicas de los dNTP con bases modificadas individualmente *per se*, y podría variar dependiendo de la composición de bases particular de los componentes oligonucleotídicos utilizados en el ensayo.

Los presentes procedimientos inventivos benefician ambas reacciones de detección estudiadas, sonda FRET escindible (TaqMan, FIGURAS 5, 6 y 9) y desencadenadas por hibridación (Scorpion, FIGURAS 10 y 11).

Los ejemplos de los ensayos de la FIGURA 5 muestran que la presente invención puede combinarse eficazmente con otras tecnologías convencionales desarrolladas para la estabilización del dúplex, en particular con las sondas o cebadores modificados que se describen en Lebedev Y. y col (1996) Genet. Anal., 13 15-21 y Prosnysk M.I. y col (1994) Genomics, 21:490-494. Se observó un sistema similar de estabilización cuando la modificación de bases se incorporaba en el ADN diana (FIGURA 5B) o en las estructuras de cebadores y sondas (FIGURA 5C). La combinación de ambas estrategias (FIGURA 5D) daba lugar a un efecto acumulativo sin precedentes en el que se observó una actuación estable del sistema a una temperatura tan alta como de 75 °C ; un logro muy significativo. La ADN polimerasa JumpStart (Sigma) que se utiliza en el presente documento es una versión bloqueada por anticuerpos de la polimerasa Taq nativa. La polimerasa es termoestable y sobrevive a las temperaturas elevadas del estadio de desnaturalización de la PCR expresando una actividad máxima e incorporando más de 60 nucleótidos por segundo, a aproximadamente 75 °C (Takagi M. y col (1997) Appl. Environ. Microbiol, 63: 4504-4510; Innis M.A. y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9436-9440). Sin el deseo de quedar ligado por teoría particular alguna, se especula que la reducción rápida anticipada en las propiedades de hibridación del oligonucleótido cuando la temperatura de la PCR excede los 70 °C puede compensarse adecuadamente por un aumento de la actividad de la polimerasa Taq que entra en un intervalo de temperatura de su actuación óptima. Esto puede explicar por qué no hay esencialmente ninguna diferencia entre las curvas en tiempo real en un intervalo amplio de temperaturas de 65 a 75 °C. Actualmente, la ejecución de la PCR a dichas temperaturas elevadas puede ser muy beneficioso de muchas maneras. Por ejemplo, ahorra tiempo en la subida de la temperatura y el ahorro de tiempo puede ser significativo en algunos instrumentos de tiempo real como el ABI 7700 o 7900 y el Bio-Rad iCycler. La PCR a temperaturas elevadas también es más específica de secuencia. Aunque los beneficios para llevar a cabo la PCR a temperaturas óptimas son obvias, los informes publicados del uso de temperaturas de hibridación por encima de 70 °C son excepcionalmente raras. La ineficacia relativa de la PCR a bajas temperaturas es bien conocida en la técnica y se introduce un estadio adicional de extensión (>72 °C) comúnmente para resolver el problema. Sin embargo, incluso una exposición corta de la reacción a baja temperatura puede desencadenar un "cebado erróneo" y la formación de cebadores diméricos. La razón principal para la utilización de bajas temperaturas en la PCR es el propio ADN y, en particular, su diversidad estructural y termodinámica. Los dúplex ricos en A/T son significativamente menos estables que los dúplex con contenido de G/C elevado. Cualquiera de los dNTP ejemplares estabilizantes del dúplex que se muestran en la FIGURA 3 se puede utilizar para la práctica de la presente invención en los ensayos de detección de ácidos nucleicos. Sin embargo, se prefiere el uso de análogos con bases modificadas de dATP y dTTP. La incorporación de estos nucleótidos con bases modificadas en los productos de amplificación estabiliza los par de bases A-T. La inestabilidad relativa de par de bases A-T frente a G-C siempre ha sido un problema, haciendo que algunas de las dianas ricas en A/T sean problemáticas o incluso no se puedan amplificar y por lo tanto indetectables. La presente invención proporciona una solución eficaz a este problema. Además, la eficacia de la presente invención está en relación directa con la composición de bases de los ácidos nucleicos detectados. Cuanto mayor es el contenido de A/T de las secuencias diana, mayor es el beneficio que se puede conseguir aplicando la presente invención en los ensayos de detección de ácidos nucleicos.

La incorporación de nucleósidos estabilizantes del dúplex en un ADN puede estabilizar el amplicón de PCR hasta un grado en el que la separación de cadenas de las cadenas del amplicón en el estadio de fusión de la PCR sería problemática. Dicho efecto se observó en los experimentos que se muestran en la FIGURA 7. La sustitución completa de dATP y dTTP por sus análogos modificados (2-amA)TP y d(5-PrU)TP da lugar al aumento de 4 ciclos del valor C_t . Se estima que la estabilidad del par de bases 2(amA)TP-d(5-PrU)TP se aproxima estrechamente a la estabilidad del G-C natural. Los dúplex ricos en G/C son extremadamente termoestables y son notorios por los problemas asociados con la separación de cadenas en la PCR. Se hizo la hipótesis de que la aplicación de dos dNTP modificados (FIGURA 7) sobre estabilizaba el dúplex de amplicón. Además, los experimentos que se muestran en la FIGURA 8 probaba que esto era correcto. Un ligero aumento de la temperatura y/o tiempo del estadio de desnaturalización volvía el valor C_t a lo normal (ciclo 26).

Los experimentos de la FIGURA 7 ilustran los aspectos potencialmente limitantes de la aplicabilidad de la presente invención en la PCR de detección. Significativamente, sin embargo, hay dos maneras para resolver el problema potencial de sobre estabilización. La primera estrategia se muestra en la FIGURA 8. La separación de cadena completa en los amplicones sobre estabilizados se puede conseguir aumentando la temperatura o el tiempo del estadio de desnaturalización. Esta estrategia está limitada de alguna manera por la inestabilidad relativa de la polimerasa Taq a y por encima de 100 °C. Sin embargo, ciertas ADN polimerasas aisladas de termófilos son más

termoestables que Taq. Por ejemplo, la *Pfu* es una ADN polimerasa altamente termoestable de la arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* (Sambrook J., Russell D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). La ADN polimerasa *Pfu* también presenta actividad exonucleasa 3' a 5' (a prueba de lectura) que hace posible que la polimerasa corrija errores de incorporación al nucleótido. Sin embargo, no tiene actividad exonucleasa 5' a 3' y su amplificación puede estar limitada por sistemas de detección desencadenados por la hibridación como el cebador Scorpion, sondas Beacon o Eclipse. En una segunda estrategia, se puede aplicar la sustitución incompleta o fraccionada de los dNTP respectivos. De acuerdo con aspectos particulares, se puede encontrar una composición equilibrada de dNTP que contengan análogos naturales y/o de estabilización del dúplex para cada secuencia determinada de ADN diana. Esta composición no interferirá con la PCR a la vez que proporciona estabilización al ensayo. En dicha composición ciertos dNTP pueden ser completamente naturales mientras que todos los otros o algunos de los otros pueden ser completa o parcialmente sustituidos por los respectivos análogos estabilizantes del dúplex. Las sustitución fraccional o completa de un dNTP puede ser una mezcla de dos o más análogos estabilizantes del dúplex de la presente invención. Por ejemplo, el dCTP se puede sustituir completa o parcialmente con una mezcla de d(5-MeC)TP y d(5-BrC)TP. Las dos estrategias mutuamente diferentes descritas en el presente documento se pueden aplicar individualmente o en combinación de las mismas cuando se practica la presente invención, pero evitando a sobre estabilización del amplicón en la PCR.

Los ensayos TaqMan y Scorpion (véase los diseños de la FIGURA 4) se habían pre-desarrollado como sistemas de detección convencionales. La aplicación de dNTP estabilizantes del dúplex de la presente invención (FIGURAS 5-7 y 10) hace posible la elevación de las temperaturas de hibridación de la PCR (FIGURAS 9 y 11) sin ningún cambio en la señal ni actuación del umbral. El efecto de estabilización para cada análogo de bases utilizado en la presente invención se puede determinar y estos datos se pueden utilizar en el diseño de sistemas recién desarrollados. Esto, a su vez, proporciona un diseño satisfactorio. La longitud de los oligonucleótidos de la PCR se puede reducir o, de manera alternativa, se puede elevar la temperatura de la PCR. Cuanto mayor es la temperatura de reacción, más rápidos son todos los estadios de la reacción de amplificación.

La presente invención mejora implícitamente pero indirectamente las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos cebadores y sondas. La estabilización de los cebadores de la PCR es particularmente importante debido al número limitado de tecnologías de estabilización del dúplex que soportan el cebado del oligonucleótido en la PCR.

Referencias relevantes citadas

- Afonina I., Zivarts M., Kutayvin I., Lukhtanov E., Gamper H. y Meyer R.B. (1997) Efficient Priming of PCR with Short Oligonucleotides Conjugated to a Minor Groove Binder. *Nucleic Acids Res.*, 25: 2657-2660. Afonina I.A., Reed M.W., Lusby E., Shishkina I.G. y Belousov Y.S. (2002) Minor groove binder-conjugated DNA probes for Quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *BioTechniques*, 32: 940-949 Aizenstein B.D., Rasmussen E.B., Hall J.G., Agarwal P., Arco D., Atiles M.W., Burris D.E., Indig M.A., Law S.M., Mast A.L., Marshall D.J., Miller C.W., Oldenberg M.C., Prudent J.R., Schneiders J.M., Brow M.A.D., Lyamichev V. (2005) Methods and compositions for detecting target sequences. Patente de EE. UU. n.º 6.913.881.
- An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H.-J., Wytiaz J., y Kong H. (2005) Characterization of a Thermostable UvrD Helicase and its Participation in Helicase Dependent Amplification, *JBC*, 280: 28952-28958. Andras S.C., Power J.B., Cocking E.C., Davey M.R. (2001) Strategies for signal amplification in nucleic acid detection, *Mol. Biotechnol.*, 19: 29-44.
- Auer T., Sninsky J.J., Gelfand D.H. y Myers T.W. (1996) Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 24: 5021-5026. Ausubel F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., y Struhl K., eds., (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Chapter 2, Section I, John Wiley & Sons, New York.
- Ausubel F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith, J.A., y Struhl K., eds., (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.1, 9.1.1-9.1.3.
- Bailly C. y Waring M.J. (1995) Transferring the purine 2-amino group from guanines to adenines in DNA changes the sequence-specific binding of antibiotics, *Nucleic Acids Res.*, 23: 885-892.
- Bailly C., Suh D., Waring M.J. y Chaires J.B. (1998) Binding of daunomycin to diaminopurine- and/or inosine-substituted DNA. *Biochemistry*, 37: 1033-1045.
- Bailly C. y Waring M.J. (1998) The use of diaminopurine to investigate structural properties of nucleic acids and molecular recognition between ligands and DNA. *Nucleic Acids Res.*, 26: 4309-4314.
- Baner J., Nilsson M., Mendel-Hartvig M., Landegren U. (1998) Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication, *Nucleic Acids Res.*, 26: 5073-5078.
- Beaucage S. L., Caruthers M. H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859-1862.
- Becker-Andre M. y Hahlbrock K. (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY), *Nucleic Acids Res.*, 17: 9437-9446.
- Bedinger P., Munn M. y Alberts B.M. (1989) Sequence-specific pausing during *in vitro* DNA replication on double-stranded DNA templates, *J. Biol. Chem.*, 264: 16880-16886.
- Belyavsky A., Vinogradova T., Rajewsky K. (1989) PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res.*, 17: 2919-2932.

- Bierne H. y Michel B. (1994) When replication forks stop, *Mol. Microbiol.*, 13: 17-23.
- Bonnet G., Tyagi S., Libchaber A. y Kramer, F.R. (1999) Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 6171-6176.
- 5 Boom W.R., Henriette M.A., Kievits T., Lens P.F. (1993) Process for isolating nucleic acid, Patente de EE. UU. n.º 5,234,809.
- Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3746-3750.
- Brow M.A.D., Hall J.S.G., Lyamichev V., Olive D.M., Prudent J.R. (1998) Detection of nucleic acid sequences by invader-directed cleavage. Patente de EE. UU. n.º 5.846.717.
- 10 Brow M.A.D., Hall J.S.G., Lyamichev V., Olive D.M., Prudent J.R. (1999) Detection of nucleic acid sequences by invader-directed cleavage. Patente de EE. UU. n.º 6.001.567.
- Brown E.L., Belagaje R., Ryan M.J., Khorana H.G. (1979) Chemical synthesis and cloning of a tyrosine tRNA gene, *Methods Enzymol.*, 68: 109-151.
- Burgner D., D'Amato M., Kwiatkowski D.P., Loakes D. (2004) Improved allelic differentiation using sequence-specific oligonucleotide hybridization incorporating an additional base-analogue mismatch, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23: 755-765.
- 15 Butkus V., Klimasauskas S., Petrauskiene L., Maneliene Z., Janulaitis A., Minchenkova L.E. y Schyolkina A.K. (1987) Synthesis and physical characterization of DNA fragments containing N4-methylcytosine and 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res.*, 15: 8467-8478.
- Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C. y Wolf D.E. (1988) Nucleic acid hybridization by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8790-8794.
- 20 Caruthers M.H., Matteucci M.D. (1984) Process for preparing polynucleotides, Patente de EE. UU. n.º 4,458,066.
- Clegg R.M. (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.*, 211: 353-388.
- Clegg R.M. (1995) Fluorescence energy transfer. *Curr. Opin. Biotech.*, 6: 103-110.
- 25 Clementi M., Menzo S., Bagnarelli P., Manzin A., Valenza A., Varaldo P.E. (1993) Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl.* 2:191-196.
- Cleuziat P. y Mandrand B. (1998) Method for amplifying nucleic acid sequences by strand displacement using DNA/RNA chimeric primers, Patente de EE. UU. n.º 5.824.517.
- Dahlberg J.E., Lyamichev V.I., Brow M.A.D. (1997) Detection of target nucleic acid molecules using synthesis-deficient thermostable DNA polymerase. Patente de EE. UU. n.º 5.691.142.
- 30 Dahlberg J.E., Lyamichev V.I., Brow M.A.D. (1998) Detection of target nucleic acid molecules using thermostable 5' nuclease. Patente de EE. UU. n.º 5.837.450.
- Dattagupta N., Stull P.D., Spingola M., y Kacian D.L. (2001) Isothermal strand displacement nucleic acid amplification, Patente de EE. UU. n.º 6.214.587.
- Davey C. y Malek L.T. (2000) Nucleic acid amplification process, Patente de EE. UU. n.º 6.063.603.
- 35 Demple B., Johnson A. y Fung D. (1986) Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H2O2-damaged *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7731-7735.
- Didenko V.V. (2001) DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): design and application, *BioTechniques*, 31, 1106-1121.
- 40 Dierick H., Stul M., De Kelder W., Marynen P. y Cassiman J.-J. (1993) Incorporation of dITP or 7-deaza dGTP during PCR improves sequencing of the product. *Nucleic Acids Res.*, 21: 4427-4428.
- Di Giusto D.A. y King G.C. (2004) Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays. *Nucleic Acids Res.*, 32: e32.
- 45 Diviacco S., Norio P., Zentilin L., Menzo S., Clementi M., Biamonti G., Riva S., Falaschi A., Giacca M. (1992) A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates, *Gene*, 122: 313-320.
- Dobrikov M.I., Sergueeva Z.A., Shaw B.R. (2003) Incorporation of (alpha-P-borano)-2',3'-dideoxycytidine 5'-triphosphate into DNA by drug-resistant MMLV reverse transcriptase and Taq polymerase. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 22(5-8): 1651-1655.
- 50 Doty P., Marmur J., Eigner J., Schildkraut C. (1960) Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46: 461-476.
- Eckstein F., ed., (1991) *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Eftink M.R. (1991) Fluorescence quenching: theory and applications. En Lakowicz J.R. (ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, V.2: 53-126.
- 55 Fong W., Modrusan Z., McNevin J., Marostenmarki J., Zin B. y Bekkaoui F. (2000) Rapid solid-phase immunoassay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2525-2529.
- Forster T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. En Sinanoglu, O. (ed.), *Modern Quantum Chemistry*, Istanbul Lectures, part III. Academic Press, New York: 93-137.
- 60 Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential, *Biotechniques*, 26: 112-122, 124-125.
- Gaffney B.L., Marky L.A. y Jones R.A. (1984) The influence of the purine 2-amino group on DNA conformation and stability. II. Synthesis and physical characterization of d[CGT(2-NH2)ACG], d[CCU(2-NH2)ACG], and d[CGT(2-NH2)AT(2-NH2)ACG]. *Tetrahedron*, 40: 3-13.
- 65 Gait M.J., ed., (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Practical Approach Series, IRL Press, Oxford.

- Gelfand D.H., Holland P.M., Saiki R.K., Watson R.M. (1993) Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase, Patente de EE. UU. n.º 5.210.015.
- Gelfand D.H., Kwok S.Y., Sninsky J.J. (1995) Reduction of non-specific amplification glycosylase using DUTP and DNA uracil. Patente de EE. UU. n.º 5.418.149.
- 5 Goldenberg O., Landt O., Schumann R.R., Gobel U.B., Hamann L. (2005) Use of locked nucleic acid oligonucleotides as hybridization/FRET probes for quantification of 16S rDNA by real-time PCR. *Biotechniques*, 38: 29 - 32.
- Gourlain T., Sidorov A., Mignet N., Thorpe S.J., Lee S.E., Grasby J.A. y Williams D.M. (2001) Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker length and rigidity. *Nucleic Acids Res.*, 29: 1898-1905.
- 10 Gu Z., Belzer S.W., Gibson C.S., Bankowski M.J., Hayden R.T. (2003) Multiplexed real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 4636-4641.
- Gundry C.N., Bernard P.S., Hermann M.G., Reed G.H. y Wittwer C.T. (1999) Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. *Genet. Test.*, 3: 365-370.
- 15 Hacia J.G., Woski S.A., Fidanza J., Edgemon K., Hunt N., McGall G., Fodor S.P.A. y Collins F.S. (1998) Enhanced high density oligonucleotide array-based sequence analysis using modified nucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.*, 26: 4975-4982.
- Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., y Giffard P.M. (2001) Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase. *BioTechniques*, 30, 852-867
- 20 Hall J.G., Lyamichev V.I., Mast A.L., Brow M.A.D. (1999) Detection of nucleic acids by multiple invasive cleavages. Patente de EE. UU. n.º 5.994.069.
- Harvey J.J., Lee S.P., Chan K., Kim J.H., Hwang E.-S., Cha C.-Y., Knutson J.R. y Han M.K. (2004) Characterization and application of CataCleave probe in real-time detection assays, *Anal. Biochem.*, 333: 246-255.
- 25 Held H.A. y Benner S.A (2002) Challenging artificial genetic systems: thymidine analogs with 5-position sulfur functionality. *Nucleic Acids Res.*, 30: 3857-3869.
- Heller M.J. y Morrison L.E. (1985) Chemiluminescent and fluorescent probes for DNA hybridization. En Kingsbury, D.T. y Falkow, S. (eds.), *Rapid Detection and Identification of Infectious Agents*. Academic Press, New York, 245-256.
- 30 Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., y Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413-417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., y Watson R. (1993) Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030.
- Howard F.B., Frazier J. y Miles H.T. (1966) A new polynucleotide complex stabilized by three interbase hydrogen bonds, poly-2-aminoadenylic acid + polyuridylic acid. *J. Biol. Chem.*, 241: 4293- 4295.
- 35 Howard F.B., Frazier J. y Miles H.T. (1976) Poly(2-aminoadenylic acid): Interaction with poly(uridylic acid). *Bio-chemistry*, 15: 3783-3795.
- Howard F.B. y Miles H.T. (1984) 2NH₂A•T helices in the ribo- and deoxypolynucleotide series. Structural and energetic consequence of 2NH₂A substitution. *Biochemistry*, 23: 6723-6732.
- 40 Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H. y Brow M.A.D. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9436-9440.
- Jäger S. y Famulok M. (2004) Generation and enzymatic amplification of high-density functionalized DNA double strands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43: 3337-3340.
- 45 Johnson M.P., Haupt L.M., Griffiths L.R. (2004) Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 32: e55.
- Kempeneers V., Renders M., Froeyen M. y Herdewijn P. (2005) Investigation of the DNA-dependant cyclohexenyl nucleic acid-dependant DNA polymerization. *Nucleic Acids Res.*, 33: 3828-3836.
- Kornberg A., y Baker T. (1992) *DNA Replication*, Segunda Edición, W. H. Freeman and Company, New York.
- 50 Kurn N. (2001) Methods and compositions for linear isothermal amplification of polynucleotide sequences, using a RNA-DNA composite primer, Patente de EE. UU. n.º 6.251.639.
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempsy R., Reed M.W., Meyer R.B. y Hedgpeth J. (2000) 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, 28: 655-661.
- 55 Kutyavin I.V., Lukhtanov E.A., Gamper H.B. y Meyer R.B. (1997) Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3718-3723.
- Kutyavin I.V., Milesi D., Hoekstra M.F. (2004) Abasic site endonuclease assay. *Solicitud de Patente* n.º 20040101893.
- 60 Kuwahara M., Hososhima S., Takahata Y., Kitagata R., Shoji A., Hanawa K., Ozaki A.N., Ozaki H., Sawai H. (2003) Simultaneous incorporation of three different modified nucleotides during PCR. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3: 37-38.
- LaDuca R.J., Fay P.J., Chuang C., McHenry C.S., Bambara R.A. (1983) Site-specific pausing of deoxyribonucleic acid synthesis catalyzed by four forms of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Biochemistry*, 22: 5177-5188.
- 65 Latorra D., Arar K., Hurley J.M. (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers, *Mol. Cell. Probes*, 17: 253-259.
- Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. (2003) Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP geno-

typing using 3' locked nucleic acid (LNA) primers, *Hum. Mutat.*, 22: 79-85.

Lee S.E., Sidorov A., Goullain T., Mignet N., Thorpe S.J., Brazier J.A., Dickman M.J., Hornby D.P., Grasby J.A. y Williams D.M. (2001) Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker length and rigidity. *Nucleic Acids Res.*, 29: 1565-1573.

Lebedev Y., Akopyans N., Azhikina T., Shevchenko Y., Potapov V., Stecenko D., Berg D., Sverdlov E. (1996) Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 5-methylcytosine are more effective as primers for PCR amplification than their nonmodified counterparts, *Genet. Anal.*, 13, 15-21.

Lehninger A.L. (1975) *Biochemistry*, 2ª edición. New York, Worth Publishers, Inc.

Lewin S.R., Vesanen M., Kostrikis L., Hurley A., Duran M., Zhang L., Ho D.D., Markowitz M. (1999) Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J. Virol.*, 73: 6099-6103.

Lie Y.S. y Petropoulos C.J. (1998) Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr. Opin. Biotech.*, 9: 43-48.

Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995) Oligonucleotide with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362.

Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J. y Mullah K.B. (1998) Self-quenching fluorescent probe. Patente de EE. UU. n.º 5.723.591.

Lizardi P. (1998) Rolling circle replication reporter systems, Patente de EE. UU. n.º 5.854.033.

Lutfalla G. y Uze G. (2006) Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments, *Methods Enzymol.*, 410: 386-400.

Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. (2002) Real-time PCR in virology, *Nucleic Acids Res.*, 30: 1292-1305.

Mackay J., Landt O. (2007) Real-time PCR fluorescent chemistries, *Methods Mol. Biol.*, 353: 237-262.

Marras S.A.E., Kramer F.R. y Tyagi S. (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.*, 30: e122.

Matthes E., Reimer K., von Janta-Lipinski M., Meisel H. y Lehmann C. (1991) Comparative inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase and cellular DNA polymerase by triphosphates of sugar-modified 5-methyldeoxycytidines and of other nucleoside analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 1254-1257.

McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R., eds (1991) *PCR: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R., eds (1995) *PCR2: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

Miller S.A., Dykes D.D. y Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215.

Modruzan Z., Mariowe C., Wheeler D., Pirseyedi M. y Bryan R. (2000) CPT-EIA assays for the detection of vancomycin resistant vanA and vanB genes in enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 37: 45-50.

Mullis K.B. (1987) Process for amplifying nucleic acid sequences, Patente de EE. UU. n.º 4.683.202.

Mullis K.B., Erlich H.A., Arnheim N., Horn G.T., Saiki R.K., y Scharf S.J. (1987) Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences, Patente de EE. UU. n.º 4.683.195.

Marmur J., Lane D. (1960) Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46: 453-461.

Narang S.A., Hsiung H.M., Brousseau R. (1979) Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments, *Methods Enzymol.*, 68: 90-98.

Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikononi P., Schuster D., Rashtchian A. (2002) Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.*, 30: e37.

Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. (2002) Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res.*, 30: 2089-2195.

Nguyen A., Zhao C., Dorris D. y Mazumder A. (2002) Quantitative assessment of the use of modified nucleoside triphosphates in expression profiling: differential effects on signal intensities and impacts on expression ratios. *BMC Biotechnology*, 2: 14.

Niesters H.G. (2001) Quantitation of viral load using real-time amplification techniques, *Methods*, 25: 419-429.

Notomi T. y Hase T. (2002) Process for synthesizing nucleic acid, Patente de EE. UU. n.º 6.410.278.

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., y Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, 28, e63.

Oehlschlager F., Schwille P. y Eigen M. (1996) Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12811-12816.

Ono T., Scaif M. y Smith L.M. (1997) 2'-Fluoro modified nucleic acids: polymerase-directed synthesis, properties and stability to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4581-4588.

Ono A. y Ueda T. (1987) Synthesis of decadeoxyribonucleotides containing N6-methyladenine, N4-methylcytosine and 5-methylcytosine: recognition and cleavage by restriction endonucleases (*Nucleotides and Nucleosides Part 74*). *Nucleic Acids Res.*, 15: 219-232.

Ortiz E., Estrada G. y Lizardi P.M. (1998) PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. *Mol. Cell. Probes*, 12, 219-226.

Piatek A.S., Tyagi S., Pol A.C., Telenti A., Miller L.P., Kramer F.R., Alland D. (1998) Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Biotechnol.*, 16: 359-363.

Porter K.W., Briley J.D., Shaw B.R. (1997) Direct PCR sequencing with boronated nucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 25: 1611-1617.

- Prosnayak M.I., Veselovskaya S.I., Myasnikov V.A., Efremova E.J., Potapov V.K., Limborska S.A., Sverdlov E.D. (1994) Substitution of 2-aminoadenine and 5-methylcytosine for adenine and cytosine in hybridization probes increases the sensitivity of DNA fingerprinting. *Genomics*, 21: 490-494.
- Prudent J.R., Hall J.G., Lyamichev V.I., Brow M.A.D., Dahlberg J.E. (1999) Invasive cleavage of nucleic acids. Patente de EE. UU. n.º 5.985.557.
- Prudent J.R., Hall J.G., Lyamichev V.I., Brow M.A.D. (2000) Cleavage of nucleic acids. Patente de EE. UU. n.º 6.090.543.
- Prudent J.R., Hall J.G., Lyamichev V.I., Brow M.A.D., Dahlberg J.E. (2002) Invasive cleavage of nucleic acids. Patente de EE. UU. n.º 6.348.314.
- Prudent J.R., Hall J.G., Lyamichev V.I., Brow M.A.D., Dahlberg J.E. (2005) Nucleic acid detection assays. Patente de EE. UU. n.º 6.875.572
- Reid R., Mar E.-C., Huang E.-S. y Topal M.D. (1988) Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and Ara nucleotides by Herpesviridae, Human α and Human β polymerases. *J. Biol. Chem.*, 263: 3898-3904.
- Robelek R., Niu L., Schmid E.L., Knoll W. (2004) Multiplexed hybridization detection of quantum dot-conjugated DNA sequences using surface plasmon enhanced fluorescence microscopy and spectrometry, *Anal. Chem.*, 76: 6160-6165.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SantaLucia J. Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465.
- Sawai H., Ozaki-Nakamura A., Mine M., Ozaki H. (2002) Synthesis of new modified DNAs by hyperthermophilic DNA polymerase: substrate and template specificity of functionalized thymidine analogues bearing a sp³-hybridized carbon at the C5 α -position for several DNA polymerases. *Bioconjug. Chem.*, 13: 309-316.
- Scheit K.H. y Rackwitz H.-R. (1982) Synthesis and physicochemical properties of two analogs of poly(dA); poly(2-aminopurine-9- β -D-deoxyribonucleotide) and poly 2-amino-deoxyadenylic acid. *Nucleic Acids Res.*, 10: 4059-4069.
- Schneeberger C., Speiser P., Kury F., Zeillinger R. (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.*, 4: 234-238.
- Schweitzer B. y Kingsmore S. (2001) Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr. Opin. Biotech.*, 12: 21-27.
- Seela F. y Röling A. (1992) 7-Deazapurine containing DNA: efficiency of c7GdTP, c7AdTP and c7IdTP incorporation during PCR-amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis. *Nucleic Acids Res.*, 20: 55-61.
- Selvin P.R. (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.*, 246: 300-334.
- Shaw B.R., Porter K.W., Sergueev D. (2004) Method of nucleic acid sequencing. Patente de EE. UU. n.º 6.808.897.
- Simeonov A. y Nikiforov T.T. (2002) Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection, *Nucleic Acids Res.*, 30: e91.
- Simpson D., Crosby R.M., y Skopek T.R. (1988) A method for specific cloning and sequencing of human hprt cDNA for mutation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 487-492.
- Sorge J.A. (2001) Methods for detection of a target nucleic acid using a probe comprising secondary structure, Patente de EE. UU. n.º 6.589.743.
- Spargo C.A., Fraiser M.S., Van Cleve M., Wright D.J., Nycz C.M., Spears P.A., Walker G.T. (1996) Detection of *M. tuberculosis* DNA using thermophilic strand displacement amplification, *Molecular and Cellular Probes*, 10: 247-256.
- Strauss P.R., Beard W.A., Patterson T.A. y Wilson S.H. (1997) Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism. *J. Biol. Chem.*, 272: 1302-1307.
- Stryer L. y Haugland R.P. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58: 719-726.
- Summers J.S. y Shaw B.R. (2001) Boranophosphates as mimics of natural phosphodiester in DNA. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1147-1155.
- Szer W. (1965) Secondary structure of poly-5-methylcytidylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20: 182-186.
- Szer W. y Shugar D. (1966) The structure of poly-5-methylcytidylic acid and its twin-stranded complex with poly-inosinic acid. *J. Mol. Biol.*, 17: 174-187.
- Takagi M., Nishioka M., Kakiyama H., Kitabayashi M., Inoue H., Kawakami B., Oka M. and Imanaka T. (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4504-4510.
- Tecott L., Barchas J.D., Eberwine J. (1992) In situ transcription in cells and tissues, Patente de EE. UU. n.º 5.168.038.
- Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J. y Brown T. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.*, 28: 3752-3761.
- Townsend L.B., ed. (1988) *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Plenum Press, NY.
- Tyagi S. y Kramer F.R. (1996) Molecular beacons-probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14: 303-308.

Tyagi S., Kramer F.R., Lizardi P.M. (1999) Detectably labeled dual conformation oligonucleotide probes, assays and kits, Patente de EE. UU. n.º 5.925.517.

Tyagi S., Marras S.A.E. y Kramer F.R. (2000) Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat. Biotechnol.*, 18: 1191-1196.

Uesugi S., Miyashiro H., Tomita K.-I. y Ikehara M. (1986) Synthesis and properties of d(ATACGCGTAT) and its derivatives containing one and two 5-methylcytosine residues. Effect of the methylation on deoxyribonucleic acid conformation. *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 51-60.

Vaghefi M., ed. (2005) Nucleoside Triphosphates and their Analogs: Chemistry, Biochemistry, and Biological Applications, Taylor & Francis.

Vermeulen N., Adams D., Afonina I., Ahmadian M., Belousov Y., Dempcy R., Gorn V., Kutayavin I., Metcalf, M., Milesi D., Mills A., Reed M.W., Sanders S., Scarr N., Shishkina I., Vorobiev A., Walburger D., Wald A., Yau E. (2002) Single nucleotide polymorphism detection with MGB Eclipse™ assays. *J. Clin. Ligand Assay*, 25: 268-275.

Vincent M., Xu Y. y Kong H. (2004) Helicase Dependent Isothermal DNA Amplification, *EMBO reports*, 5: 795 - 800.

Walker G.T., Linn C.P. y Nadeau J.G. (1996) DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 24, 384-353.

Walker G.T., Little M.C., Nadeau J.G. y Shank D.D. (1992) Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 392 - 396.

Walker G.T., Little M.C., y Nadeau J.G. (1993) Nucleic acid target generation. Patente de EE. UU. n.º 5.270.184

Walsh P.S., Metzger D.A., y Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506-513.

Wang J.X., Sergueev D.S. y Shaw B.R. (2005) The effect of a single boranophosphate substitution with defined configuration on the thermal stability and conformation of a DNA duplex. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 24(5-7): 951-955.

Ward B., Snyder L.M., Li C., Song K., Oppen K.E., Uder S., Hernan R. (2005) Recombinant DNA processes using a dNTP mixture containing modified nucleotides. Patente de EE. UU. n.º 6.902.914.

Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.*, 17: 804-807.

Wilson III D.M., Takeshita M. y Demple B. (1997) Abasic site binding by the human apurinic endonuclease, Ape, and determination of the DNA contact sites. *Nucleic Acids Res.*, 25: 933-939.

Wittwer C.T., Ririe K.M., Rasmussen R.P. (2001) Monitoring amplification of DNA during PCR, Patente de EE. UU. n.º 6.174.670.

Wittwer C.T., Ririe K.M., Rasmussen R.P. (2003) Monitoring hybridization during PCR using SYBR™ Green I, Patente de EE. UU. n.º 6,569,627.

Wong K.K. y McClelland, M. (1991) PCR with 5-methyl-dCTP replacing dCTP. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1081-1085. Yi J., Zhang W., Zhang D.Y. (2006) Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification, *Nucleic Acids Res.*, 34: e81.

You Y., Moreira B.G., Behlke M.A. y Owczarzy R. (2006) Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.*, 34: e60.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KUTYAVIN, Igor

<120> USO DE TRIFOSFATOS DE DESOXINUCLEÓSIDOS CON LAS BASES MODIFICADAS PARA MEJORAR LA DETECCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

<130> 67898-7

<150> 60/795.705

<151> 28-04-2006

<150> 60/849.526

<151> 04-10-2006

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 1

	tattaataat attattaaat at 22
	<210> 2
	<211> 22
	<212> ADN
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Oligonucleótido
	<400> 2
	tatcaataat attattaaat at 22
10	<210> 3
	<211> 22
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
15	<223> Oligonucleótido
	<400> 3
	tatcaataat gttattaaat at 22
	<210> 4
	<211> 22
20	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Oligonucleótido
	<400> 4
25	tatcaatgat gttattaaat at 22
	<210> 5
	<211> 22
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> Oligonucleótido
	<400> 5
	tatcaatgat gttattagat at 22
35	<210> 6
	<211> 22
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Oligonucleótido
40	<400> 6
	catcaatgat gttattagat at 22
	<210> 7
	<211> 22
	<212> ADN
45	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Oligonucleótido
	<400> 7
	catcagtgat gttattagat at 22
50	<210> 8

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 8
 catcagtgat gtcattagat at 22

 10 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 15 <400> 9
 catcagtgat gtcattagac at 22

 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 10
 catcagtgac gtcattagac at 22

 25 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 30 <400> 11
 catcagtgac gtcattagac ac 22

 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 12
 catcagtgac gtcactagac ac 22

 40 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Oligonucleótido

 <400> 13
 catcagtgac gtcactggac ac 22

 <210> 14
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 14
 cgtcagtgac gtcactggac ac 22
 5 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 15
 cgtcagtggc gtcactggac ac 22

 15 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 20 <400> 16
 cgtcagtggc gtcgctggac ac 22

 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 17
 cgtcagtggc gtcgctggac gc 22

 30 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 35 <400> 18
 cgccagtggc gtcgctggac gc 22

 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 19
 cgccagtggc gccgctggac gc 22

 45 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 20
 cgccggtggc gccgctggac gc 22

 <210> 21
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 21
 10 cgccggtggc gccgccggac gc 22

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

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 22
 cgccggtggc gccgccgggc gc 22

 20 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 25 <400> 23
 cgccggcggc gccgccgggc gc 22

 <210> 24
 <211> 96
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 24

 cggggcattcc tgaagctgac agcattcggg ccgagatgtc tcgctccgtg gccttagctg 60
 tgcctcgcgt acctctctctt tctggcctgg aggcta 96

 35 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido

 <400> 25
 gcattcctga agctgacagc a 21

 <210> 26
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 26

gatgagagag aaagaccgga cctc 24

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 27
 ccgtggcctt agctgtgctc gc 22

10

<210> 28
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

15

<400> 28
 cgggcgatgt ctcgctccgt ggccttacgc ccg 33

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:

proporcionar una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico diana, al menos un oligonucleótido cebador, una ADN polimerasa, y una mezcla de 5'-trifosfatos de desoxinucleósidos que contienen al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas;
amplificar el ácido nucleico diana, en el que el al menos un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas se incorpora en amplicones de ADN que proporcionan copias de un ADN modificado con propiedades de hibridación mejoradas;
proporcionar al menos un oligonucleótido sonda e hibridar el al menos un oligonucleótido sonda con el ADN modificado para formar un complejo; y
detectar el complejo, en el que la presencia del complejo es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es ADN.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es ARN.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos un oligonucleótido cebador y al menos un oligonucleótido sonda son porciones de la misma molécula.

5. el procedimiento de la reivindicación 1, en el que se amplifican y detectan más de un ácido nucleico diana, y en el que se proporciona al menos uno de dichos oligonucleótidos cebadores para cada ácido nucleico diana amplificado y/o detectado.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la amplificación del ácido nucleico diana comprende el uso de una amplificación isotérmica.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección del ácido nucleico diana se lleva a cabo después de la amplificación.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección de dicho ácido nucleico diana se lleva a cabo en tiempo real.

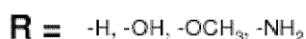
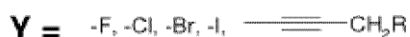
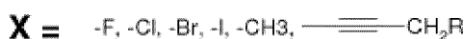
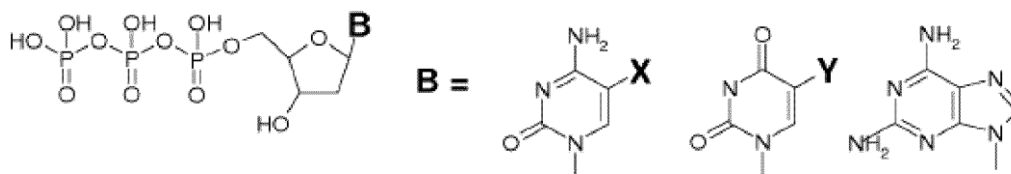
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los oligonucleótidos cebadores u oligonucleótidos sonda o los ADN modificados está inmovilizado en un soporte sólido en los estadios de amplificación o detección, o en ambos estadios.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas sustituye completamente el respectivo dNTP natural.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas representa una fracción del respectivo dNTP natural.

12. Los procedimientos de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 10 y 11, en el que la amplificación del ácido nucleico diana comprende el uso de más de un dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas, que en cada caso sustituye o representa una fracción del respectivo dNTP natural.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dNTP estabilizante del dúplex con bases modificadas tiene la Fórmula I:



14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende al menos dos oligonucleótidos cebadores suficientes para proporcionar una amplificación exponencial del ácido nucleico diana.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el oligonucleótido sonda es una sonda FRET, en el que la sonda FRET cambia sus propiedades de fluorescencia al formarse el complejo con el ADN modificado, y en el que los cambios son indicativos de la presencia del complejo.

5

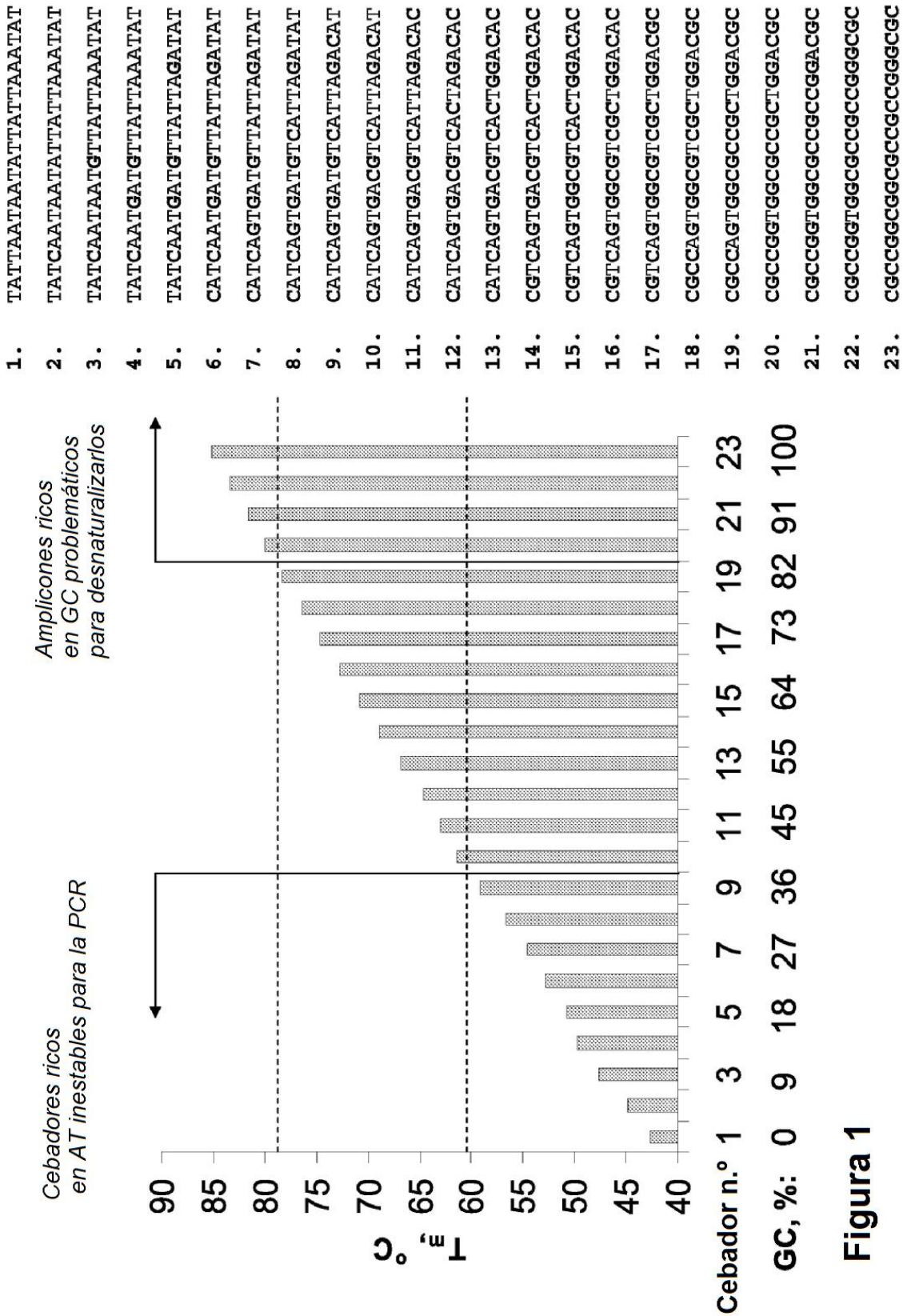


Figura 1

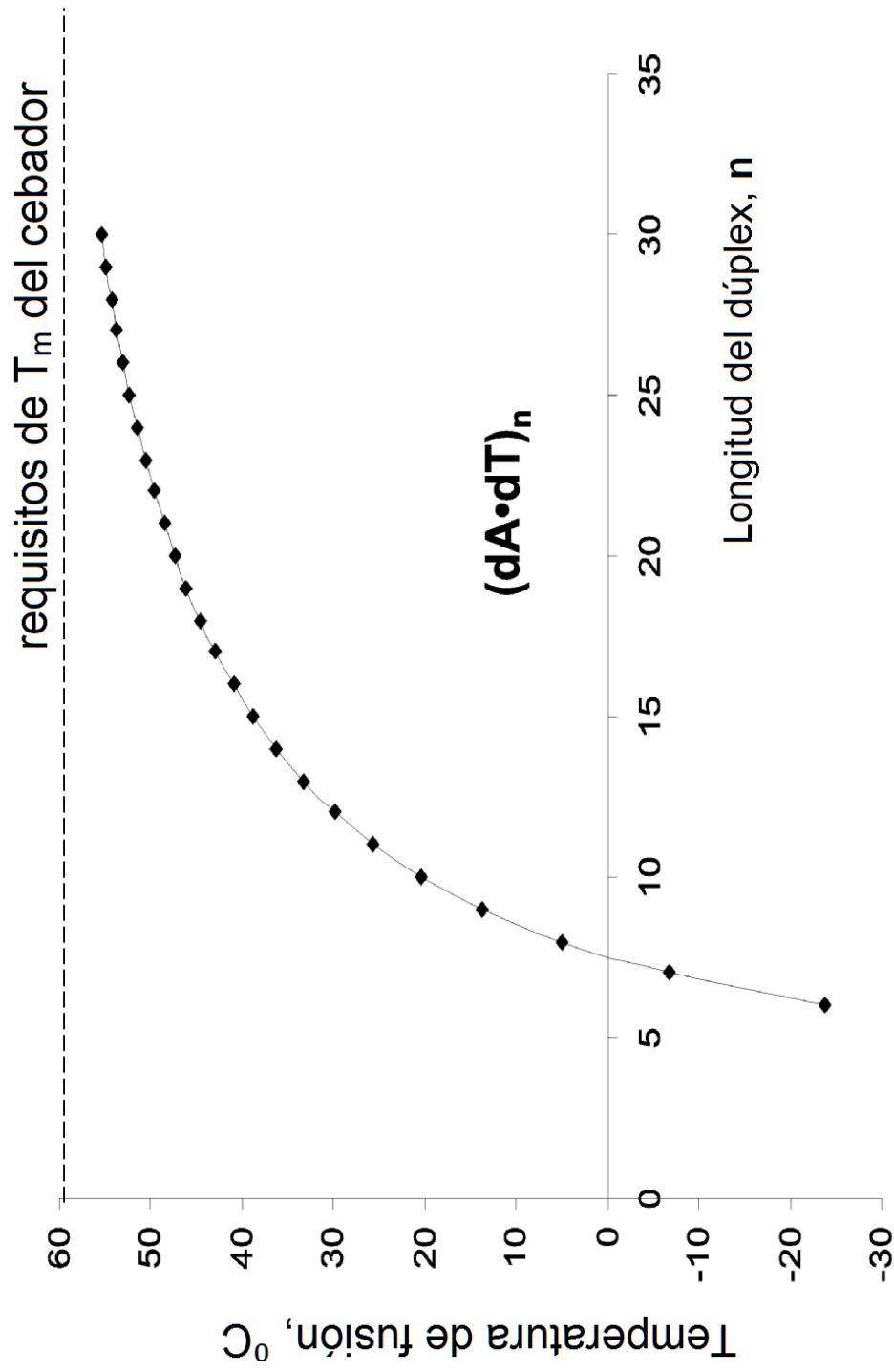


Figura 2

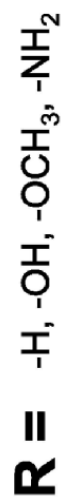
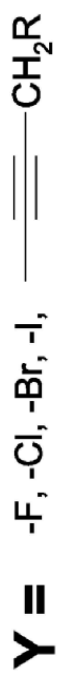
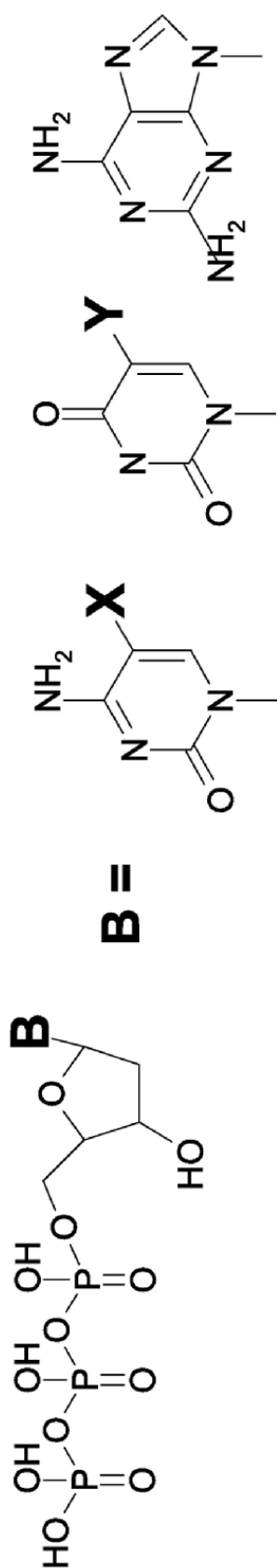


Figura 3

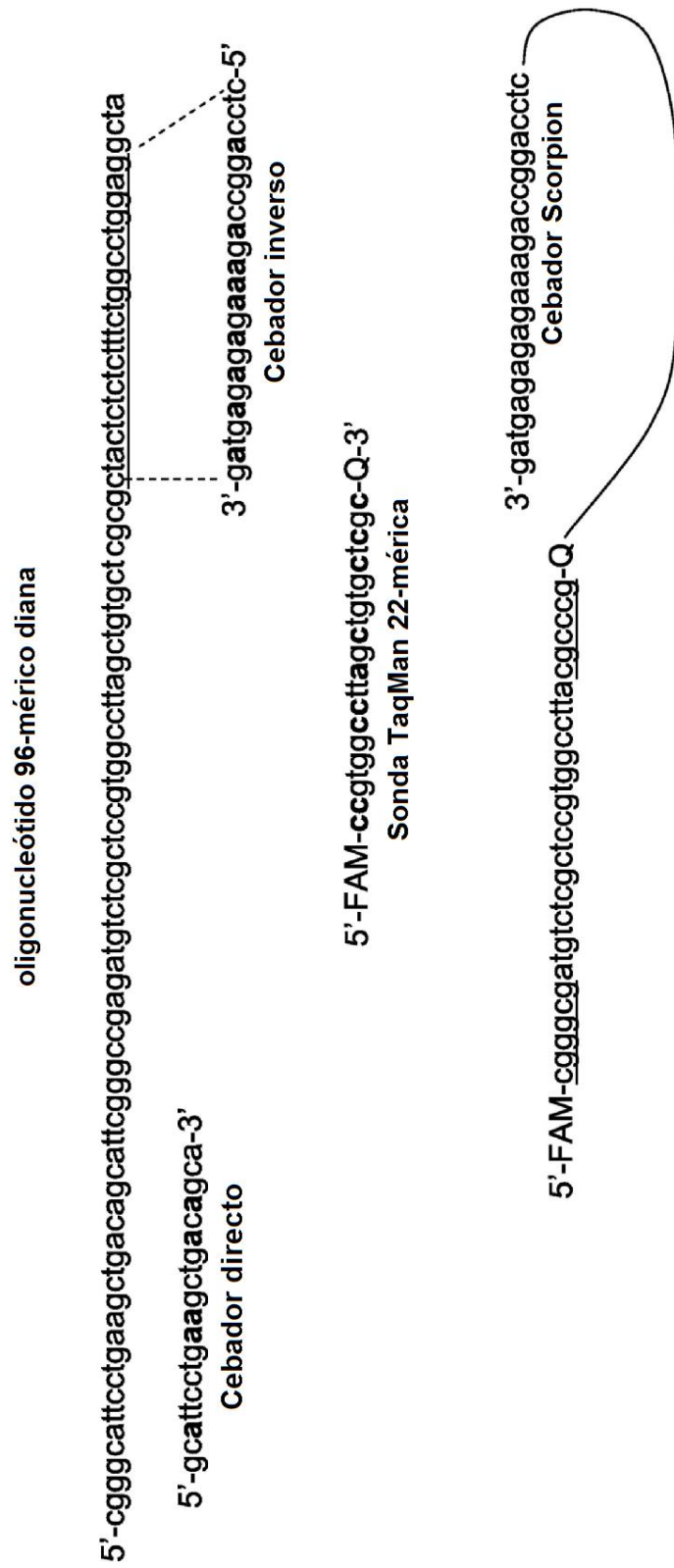


Figura 4

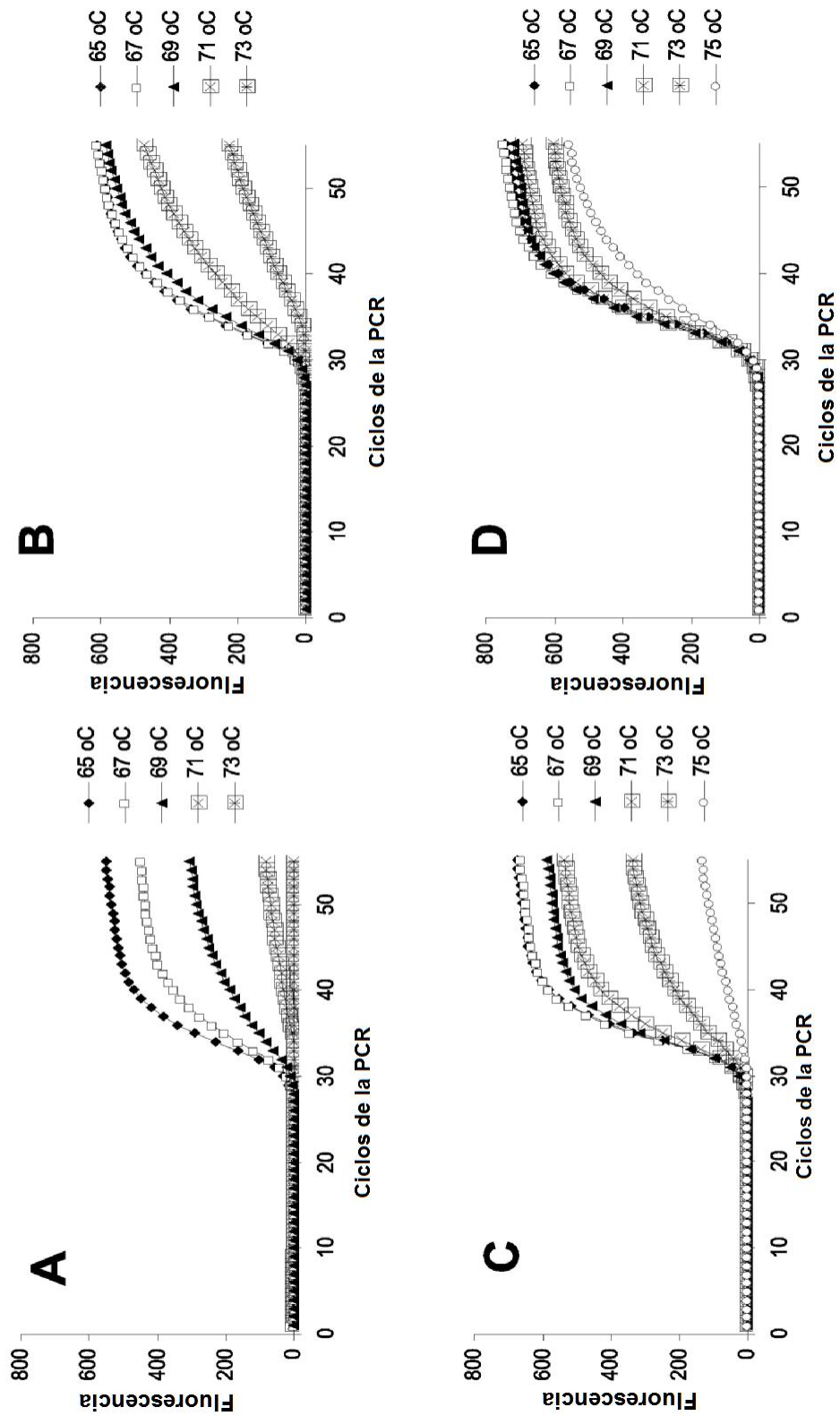


Figura 5

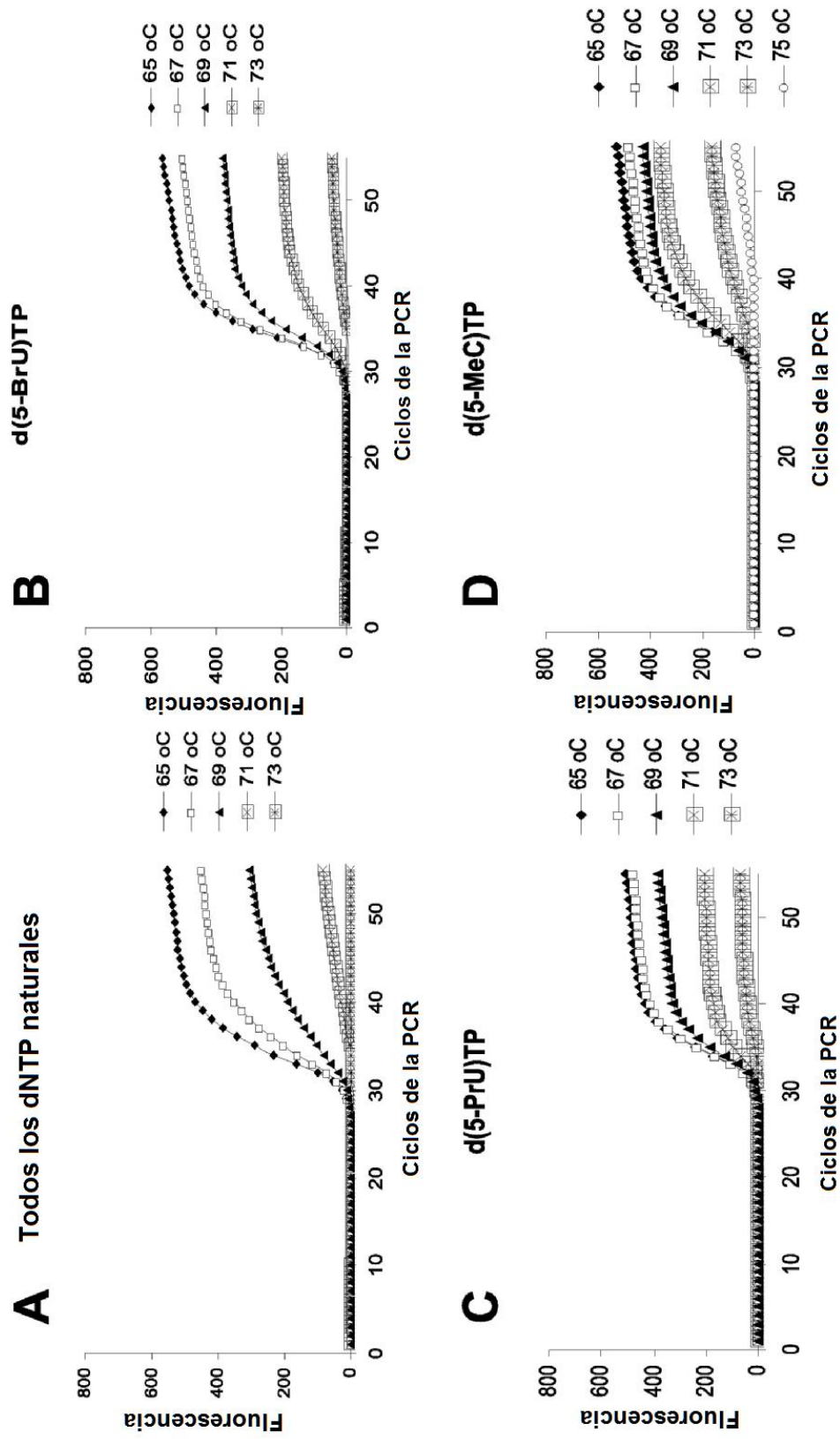


Figura 6

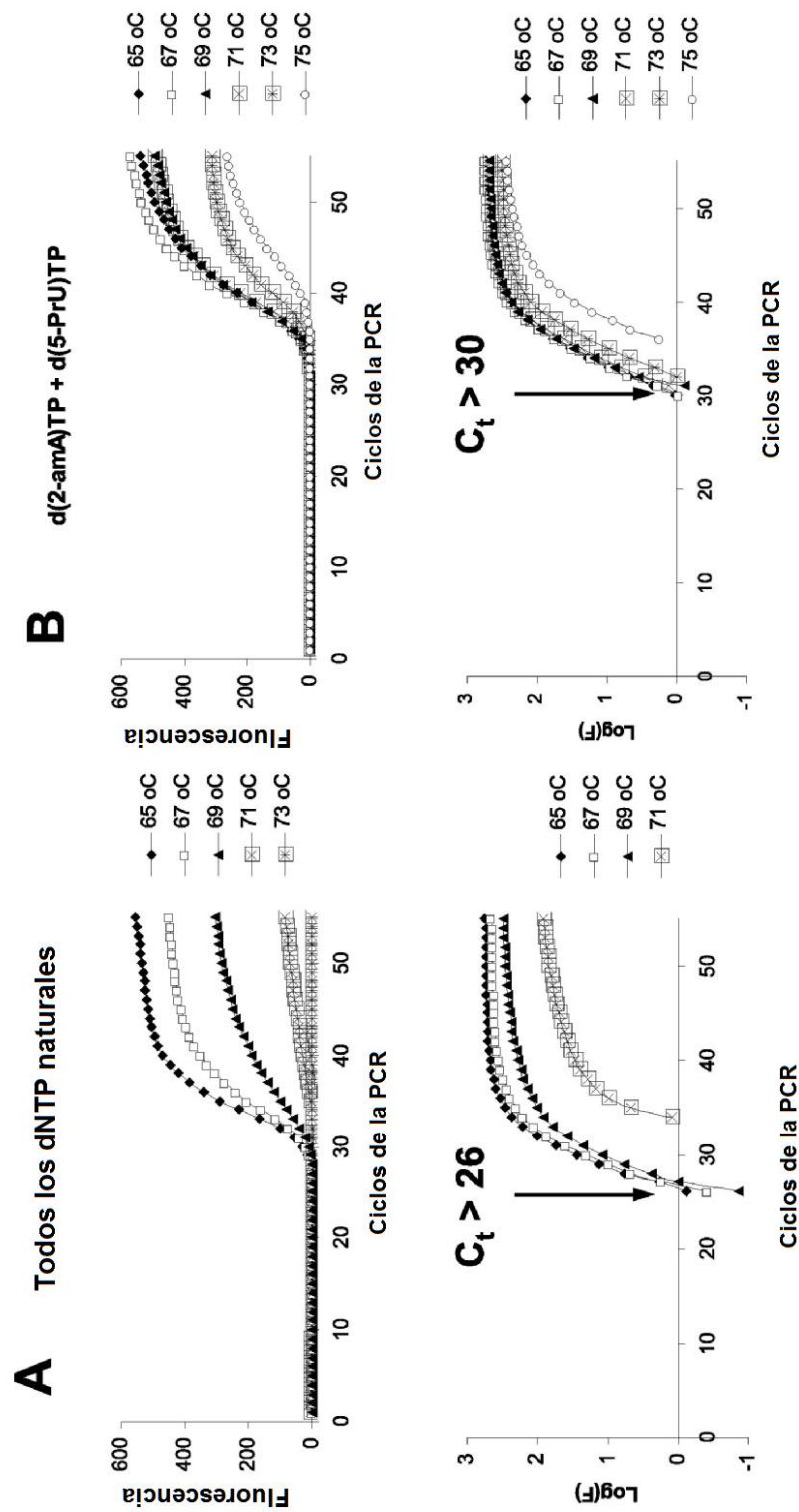


Figura 7

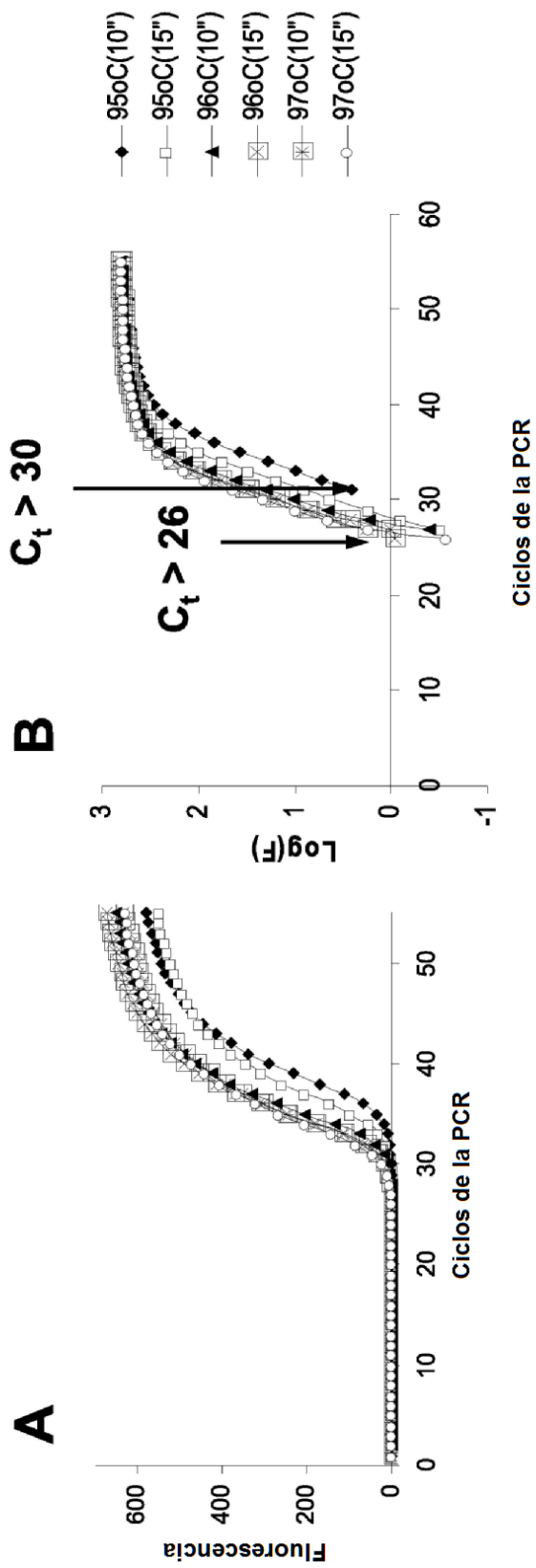


Figura 8

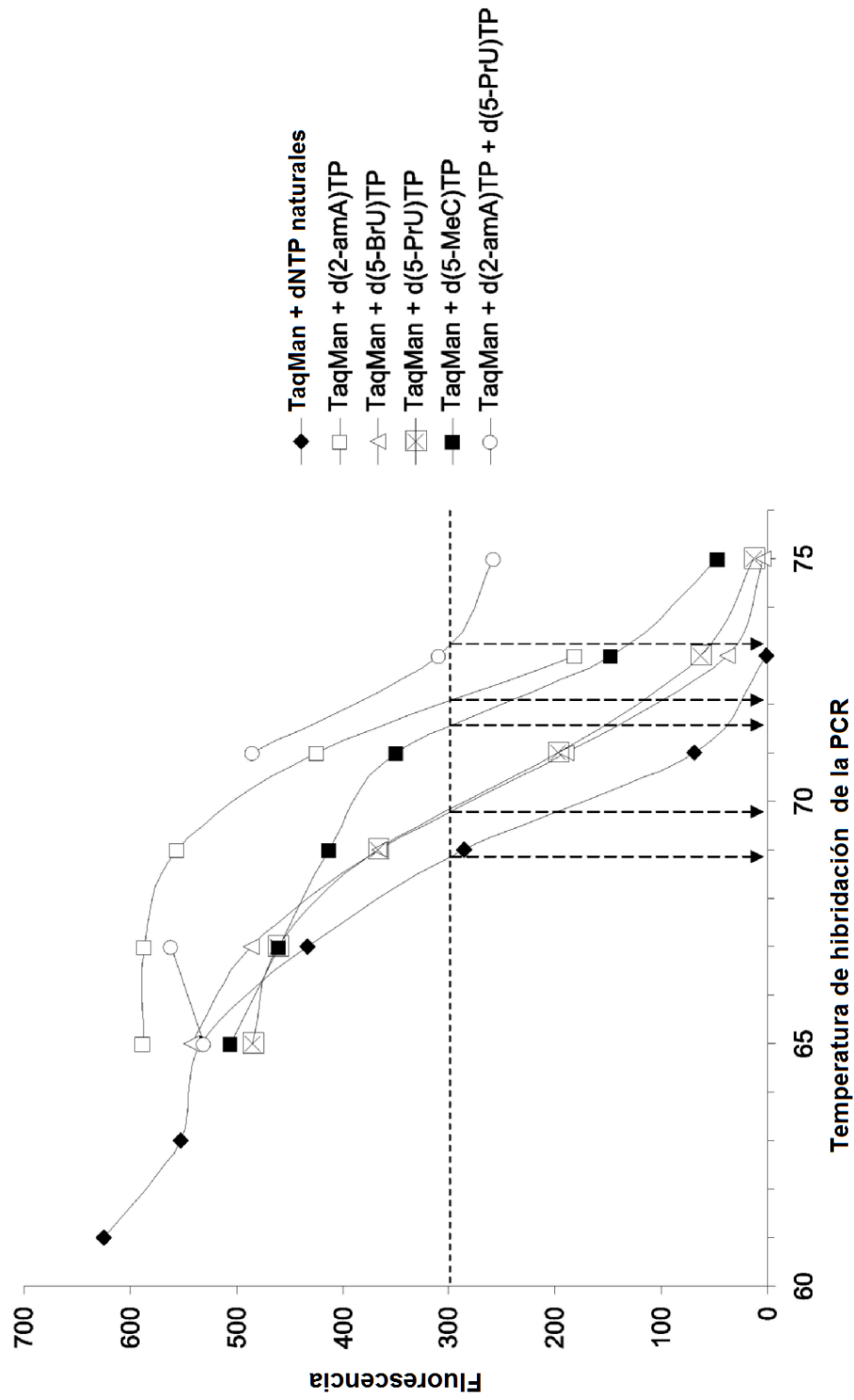


Figura 9

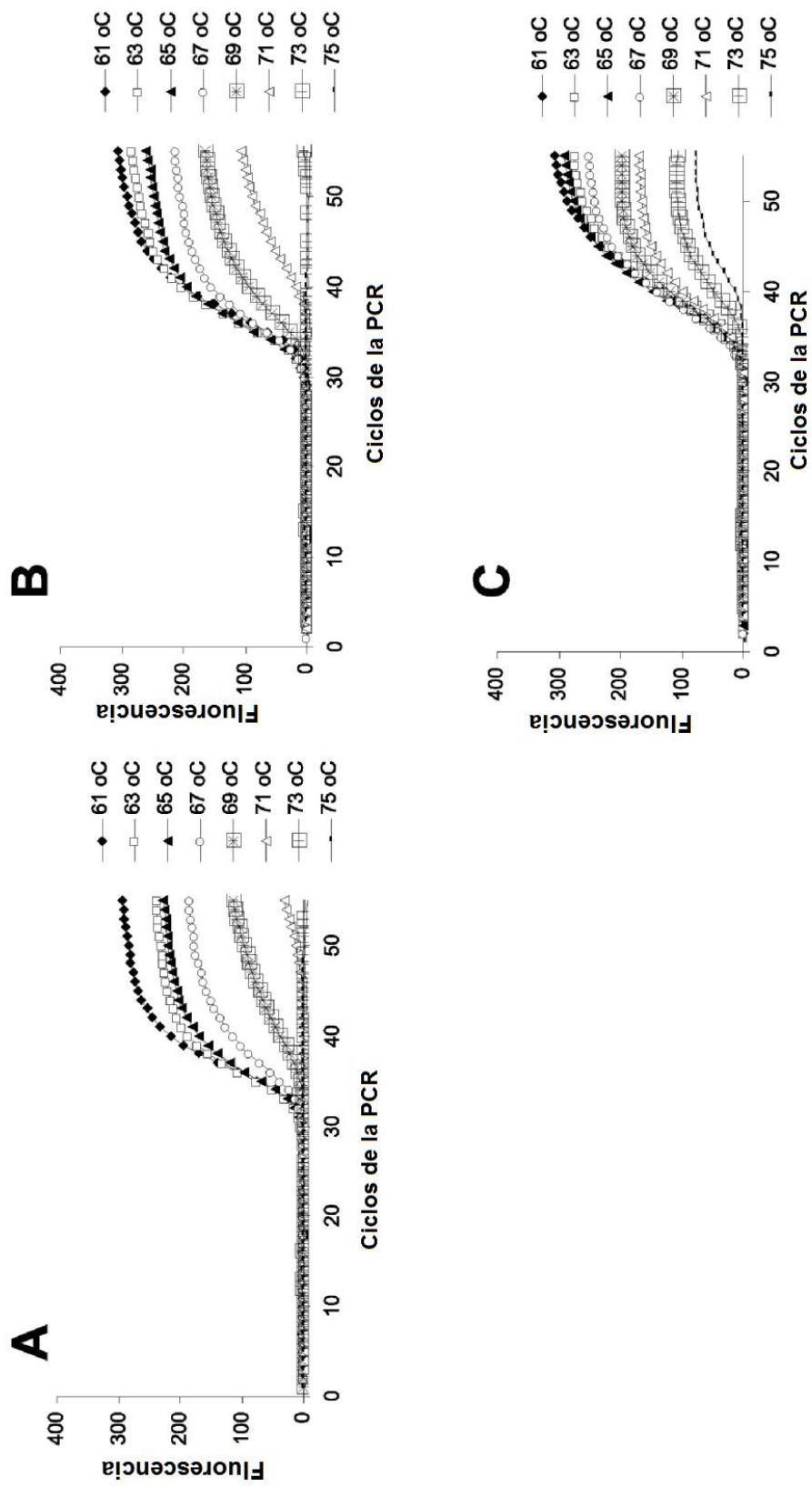


Figura 10

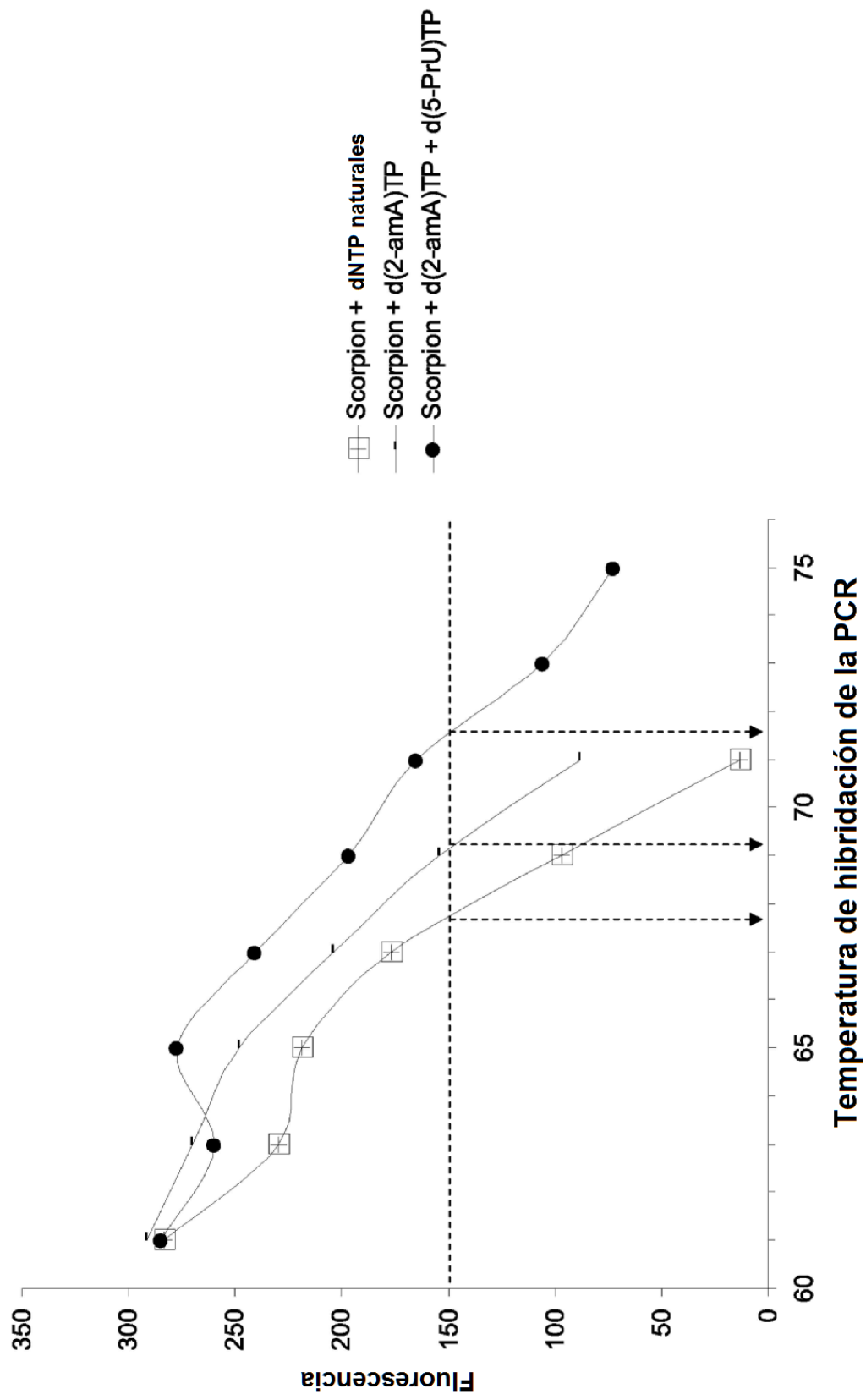


Figura 11