



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 652**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04028280 .8**
86 Fecha de presentación : **30.11.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1538221**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Oligonucleótidos que contienen bastones moleculares.**

30 Prioridad: **02.12.2003 EP 03027753**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Heindl, Dieter;**
Reiser, Astrid;
Tabiti, Karim;
Junius, Martina y
Hauber, Alexander

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 305 652 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

Oligonucleótidos que contienen bastones moleculares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los oligonucleótidos químicamente modificados. Más precisamente, la presente invención se refiere al suministro de oligonucleótidos químicamente modificados que pueden emplearse como sondas de hibridación bien sea con la tecnología de la PCR a tiempo real, o bien sea con la tecnología de matrices de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la técnica anterior**

La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica fundamental en biología molecular. El análisis del ácido nucleico mediante la PCR requiere la preparación de la muestra, la amplificación y el análisis del producto. Aunque estos pasos se efectúan habitualmente secuencialmente, la amplificación y el análisis pueden tener lugar simultáneamente. Pueden añadirse colorantes que tiñen el ADN, ó sondas fluorescentes, a la mezcla de la PCR antes de la amplificación y pueden emplearse para analizar los productos de la PCR durante la amplificación. El análisis de la muestra tiene lugar al mismo tiempo que la amplificación en el mismo tubo dentro del mismo aparato. Este método combinado disminuye la manipulación de la muestra, ahorra tiempo y reduce en gran manera el riesgo de contaminación del producto en las subsiguientes reacciones, dado que no hay necesidad de retirar las muestras de sus recipientes cerrados, para el análisis posterior. El concepto de la combinación de la amplificación con el análisis del producto ha recibido el nombre de "PCR a tiempo real". Véase por ejemplo, la patente U.S. nº 6.174.670.

25 *Formatos de detección de la PCR a tiempo real*

En la PCR a tiempo cinético real, la formación de los productos de la PCR se monitoriza en cada ciclo de la PCR. La amplificación se mide habitualmente en termocicladores que tienen dispositivos adicionales para la medición de las señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación.

Formato del colorante que se une al ADN: Dado que la cantidad de producto de amplificación de doble cadena excede habitualmente la cantidad de ácido nucleico originalmente presente en la muestra que se va a analizar, pueden emplearse colorantes que tiñen específicamente el ADN de doble cadena, los cuales después de la excitación con una longitud de onda apropiada muestran una fluorescencia potenciada solamente si están unidos a un ADN de doble cadena. De preferencia pueden emplearse solamente aquellos colorantes que como el Verde Sybr II, por ejemplo, no afectan la eficiencia de la reacción PCR.

Todos los otros formatos conocidos en la técnica requieren el diseño de una sonda de hibridación marcada fluorescente que emite fluorescencia solamente después de unirse a su ácido nucleico diana.

Sondas TaqMan: Una sonda de hibridación monocatenaria se marca con dos componentes. Cuando el primer componente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el llamado apagador, de acuerdo con el principio de transferencia de la energía de resonancia fluorescente. Durante el paso de reasociación de la reacción PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y se degrada mediante la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa durante la subsiguiente fase de prolongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el apagador están espacialmente separados entre sí y así puede medirse una emisión de fluorescencia del primer componente. Los ensayos con la sonda TaqMan están descritos con detalle en las patentes US 5.210.015, US 5.538.848 y US 5.487.972. Las sondas de hibridación TaqMan y las mezclas de reactivos están descritas en la patente US 5.804.375.

Faros moleculares: Estas sondas de hibridación están también marcadas con un primer componente y con un apagador, estando las marcas localizadas de preferencia en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes están espacialmente próximos cuando están en solución. Después de la hibridación a los ácidos nucleicos diana, ambos componentes están separados entre sí de tal forma que después de la excitación con luz de una longitud de onda apropiada, puede medirse la emisión de fluorescencia del primer componente (patente US 5.118.801). Los faros moleculares pueden emplearse para el análisis de la curva de fusión con el fin de identificar alelos específicos o polimorfismo (ver más adelante).

Sondas de hibridación FRET: El formato de ensayo de la sonda de hibridación FRET es especialmente de utilidad para todas las clases de ensayos de hibridación homogénea (Matthews, J.A., y Kricka, L.J., Analytical Biochemistry ("Bioquímica Analítica") 169 (1988) 1:25. Está caracterizada por dos sondas de hibridación monocatenarias que se emplean simultáneamente y son complementarias a los sitios adyacentes de la misma cadena de ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas están marcadas con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excitan con luz de una determinada longitud de onda, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, de tal forma que la emisión de fluorescencia del segundo componente puede medirse cuando ambas sondas de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana que va a detectarse.

Cuando se reasocian a la secuencia diana, las sondas de hibridación deben situarse muy cerca entre sí, en un arreglo de la cabeza a la cola. Habitualmente, el hueco entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda es el máximo pequeño posible, es decir, de 1 a 5 bases. Esto permite una estrecha proximidad del compuesto FRET dador y el compuesto FRET receptor, que es típicamente de 10 a 100 Angstroms.

5 Alternativamente, para monitorizar el aumento de la fluorescencia del componente FRET receptor, es también posible monitorizar la disminución de la fluorescencia del componente FRET dador, como una medida cuantitativa del transcurso de la hibridación.

10 En particular, el formato de la sonda de hibridación FRET puede ser empleado en la PCR en tiempo real, con el fin de detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de la PCR en tiempo real, el formato de la sonda de hibridación FRET se ha comprobado que es altamente sensible, exacto y fiable (patentes WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Todavía, el diseño de las secuencias apropiadas de la sonda de hibridación FRET, puede limitarse algunas veces debido a las especiales características de la secuencia del ácido nucleico diana que hay que detectar.

15 Como una alternativa al empleo de las dos sondas de hibridación FRET es posible también emplear un cebador marcado fluorescentemente y solamente una sonda oligonucleótida marcada (Bernard, P. S. *et al.*, Analytical Biochemistry ("Bioquímica Analítica") 255 (1998) 101-107). A este respecto, puede escogerse arbitrariamente si el cebador se marca con el compuesto FRET dador o el compuesto FRET receptor.

20 Existen muchos distintos pares de colorantes fluorescentes conocidos en la técnica que de acuerdo con la invención son principalmente capaces de actuar juntos como un par FRET dador/FRET receptor. Antes de la presente invención no se había descrito ningún ejemplo funcional caracterizado porque se habían empleado 4 diferentes pares FRET con éxito en un ensayo de detección múltiple. Entre otras razones, esto puede ser debido a la falta de instrumentación apropiada y, además, debido al hecho de que la funcionalidad del proceso FRET de un par FRET específico está interferido por otros compuestos fluorescentes que se hallan presentes en la misma mezcla de reacción.

25 Además de la PCR y la PCR en tiempo real, se emplean las sondas de hibridación FRET y los faros moleculares para el análisis de la curva de fusión. En este tipo de análisis, el ácido nucleico diana se amplifica primero en una reacción PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden estar ya presentes durante la reacción de amplificación o pueden añadirse a continuación. Una vez terminada la reacción PCR, la temperatura de la muestra se aumenta gradualmente y la fluorescencia se detecta mientras la sonda de hibridación está unida al ADN diana. A la temperatura de fusión las sondas de hibridación se liberan de su diana y la señal fluorescente va decreciendo inmediatamente al nivel original. Esta disminución se monitoriza con una fluorescencia adecuada frente a una gráfica temperatura-tiempo, de forma que puede determinarse el valor de una primera derivada, al cual se observa el máximo descenso de fluorescencia.

30 Sin embargo, en algunos casos y en función del diseño de las sondas de hibridación FRET ó de las sondas de hibridación tales como los faros moleculares, las primeras derivadas de dichas gráficas temperatura-tiempo no tienen las esperadas curvas en forma de campana sino que forman deformaciones que no pueden ser explicadas mediante el análisis primario de las secuencias. Los procesos fisicoquímicos que subyacen en el curso del tiempo de la fusión de híbridos de ADN, en la actualidad no pueden predecirse exactamente por ningún modelo matemático. Así, en la práctica, el experto en la especialidad necesita diseñar y ensayar varias sondas de hibridación similares o pares de sondas de hibridación FRET con el fin de identificar y seleccionar un par adecuado que pueda generar curvas de fusión que tengan más o menos idealmente una curva en forma de campana.

35 Una posibilidad de soslayar este problema es la introducción de emparejamientos artificiales como se ha descrito en la patente WO 97/46711. Sin embargo, la introducción de emparejamientos, solamente en algunos casos, da por resultado curvas de fusión no idealmente formadas, especialmente en el caso de análisis múltiple empleando varias sondas de hibridación o varios pares de sondas de hibridación FRET en el mismo recipiente de reacción.

40 Así pues, existe en la técnica la necesidad de proporcionar oligonucleótidos y especialmente sondas de hibridación FRET con un comportamiento mejorado de la curva de fusión.

55 **Breve descripción de la invención**

Este problema se soluciona proporcionando los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

60 Más precisamente, la presente invención va dirigida a los oligonucleótidos que comprenden un bastón molecular axial interno, en donde dicho oligonucleótido es una sonda TaqMan, un faro molecular o un miembro de un par de sondas de hibridación FRET.

65 También se describe que el bastón molecular conecta una primera parte y una segunda parte de una cadena de un oligonucleótido, caracterizada porque el bastón molecular conecta covalentemente el extremo 3' de un primer radical nucleótido, siendo dicho radical el extremo terminal 3' de dicha primera parte de dicha cadena con el extremo 5' de un segundo radical nucleótido, siendo dicho segundo radical nucleótido el terminal 5' de dicha segunda parte de dicha cadena.

ES 2 305 652 T3

Además, se describe que el bastón molecular está covalentemente conectado a la posición 5' del radical terminal 5' ó a la posición 3' del radical terminal 3'. De preferencia, el bastón molecular se conecta al extremo 5' ó 3' del oligonucleótido mediante un grupo fosfato.

5 En otro aspecto, la presente invención va dirigida a una composición que comprende un oligonucleótido como se ha descrito más arriba.

En un tercer aspecto, la presente invención va dirigida a un kit que comprende un oligonucleótido como se ha descrito más arriba.

10 En otro aspecto, la presente invención va dirigida a una fosforamidita que comprende un bastón molecular.

Un oligonucleótido que contiene un bastón molecular puede por ejemplo emplearse como un cebador para una reacción de extensión de un cebador o un cebador para una reacción de amplificación de un ácido nucleico.

15 Un oligonucleótido que contiene un bastón molecular de acuerdo con la invención, puede emplearse como una sonda de hibridación. En una versión específica, empleando una sonda de hibridación de acuerdo con la invención, se monitoriza la dependencia a la temperatura de la hibridación, por ejemplo realizando un análisis de la curva de fusión.

20 Un oligonucleótido que contiene un bastón molecular puede también ser inmovilizado sobre un soporte sólido. De preferencia, es el bastón molecular el que conecta la cadena de los radicales de nucleótido al soporte sólido.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención va dirigida a aquellos oligonucleótidos que contienen un bastón molecular axial interno, en donde dicho oligonucleótido es una sonda Taqman, un faro molecular o un miembro de un par de sondas de hibridación FRET. Una detallada revisión sobre los bastones moleculares viene dada por Schwab *et al.*, en Chem. Rev. 99 (1999) 1863-1933.

30 En el contexto de la presente invención, los bastones moleculares axiales pueden definirse como eslabones que conectan dos moléculas (p. ej. dos partes de un oligonucleótido) de tal forma que las posiciones relativas de cada uno de los átomos de carbono que contribuyen a la estructura interna del bastón quedan fijas entre sí. En otras palabras: un bastón molecular es una estructura rígida que por sí misma no puede ser unida. Como consecuencia, la distancia entre los átomos de dos moléculas que están covalentemente unidas a la estructura del bastón es fija y no puede ser alterada.

35 Dentro del ámbito de la presente invención, puede emplearse cualquier tipo de bastón molecular que sea compatible con los protocolos de síntesis de oligonucleótidos. De preferencia, los bastones empleados para la síntesis de oligonucleótidos de acuerdo con la invención son estructuras químicas simples pequeñas que están compuestas de solamente unos pocos átomos de carbono. Se prefieren también aquellos tipos de bastones moleculares que pueden sintetizarse de forma muy económica y fácilmente por métodos convencionales de química orgánica partiendo de compuestos básicos que de preferencia sean comercialmente adquiribles.

40 En una versión preferida, el bastón es un único bastón molecular engarzado axialmente. Por definición, los bastones moleculares individuales engarzados axialmente están unidos mediante un enlace covalente único a cada una de las dos moléculas conectadas por el bastón. Por ejemplo, el bastón molecular está compuesto simplemente de dos átomos de carbono unidos por un etileno. Otros ejemplos de bastones moleculares engarzados individualmente, que no limitan el ámbito de la presente invención, son el biciclopentano, biciclooctano, cubano, benceno, naftaleno, antraceno, pireno, piridina, o porfirina. Las moléculas y especialmente los oligonucleótidos engarzados por un bastón molecular axial individualmente conectados pueden ser relativamente rotados entre sí, aunque la distancia entre los átomos de las dos moléculas que están covalentemente unidas a la estructura del bastón permanece fija.

En una versión altamente preferida, el bastón molecular axial unido individualmente, comprende o consta de, o bien un grupo etileno, o bien alternativamente, un grupo fenileno.

55 En otra versión altamente preferida, el bastón molecular axial unido individualmente, comprende o consta de una estructura molecular como sigue:



65 En una versión alternativa, el bastón es un bastón molecular axial unido doblemente. Por definición, los bastones moleculares axiales unidos doblemente están engarzados mediante dos enlaces covalentes a cada una de las dos moléculas conectadas mediante el bastón. Ejemplos de bastones moleculares axiales doblemente unidos, son el etileno, ciclobutano, ciclohexano y ciclohexadieno. Las moléculas y especialmente los oligonucleótidos unidos mediante un bastón molecular axial doblemente conectado no pueden rotarse relativamente uno contra el otro, además del hecho

ES 2 305 652 T3

de que la distancia entre los átomos de las dos moléculas que están covalentemente unidas a la estructura del bastón permanece fija.

Figura también dentro del ámbito de la presente invención, si el bastón molecular axial de un oligonucleótido está compuesto de varios módulos tales como el polietileno, e.c. Por lo tanto, en función del número de módulos que se emplean, la longitud del bastón molecular axial puede ajustarse de conformidad a lo requerido.

La síntesis de oligonucleótidos que contienen bastones moleculares puede ser realizada de acuerdo con la química convencional de síntesis de oligonucleótidos.

También se describe que el bastón molecular está covalentemente unido a la posición 3'-OH del radical terminal 3' ó en la posición 3' del radical terminal 3'. Para este bastón molecular axial puede introducirse en el extremo 3' de un oligonucleótido químicamente sintetizado empleando un CPG (cristal de poro controlado) apropiado, el cual comprende un espaciador trifuncional. Esto puede hacerse aplicando un CPG que ya lleva un bastón molecular análogo a los compuestos, y en los métodos descritos en la patente US 5.290.925.

Otra posibilidad es que el bastón molecular se una covalentemente a la posición 5' del radical terminal 5'. Para esto puede unirse un bastón molecular axial a la naciente cadena de oligonucleótidos empleando una fosforamidita apropiada. Opcionalmente, puede introducirse un grupo amino en el extremo libre del bastón, el cual puede servir como base para subsiguientes estrategias convencionales después del marcado.

El método de la química de la fosforamidita es ya bien conocido por cualquier persona experta en la técnica. Un grupo fosforoso 3' de un nucleósido reacciona con el grupo 5'-hidroxilo de otro nucleósido. La reacción tiene lugar del 3' al 5' entre cada fosforamidita con un monómero protegido con 5'-dimetoxitritilo suministrado en solución y el crecimiento del oligonucleótido reactivo en 3' unido a un substrato inerte. En comparación con otros métodos, los rendimientos de copulación inherentes son típicamente del orden de $98 \pm 0,5\%$, dando por resultado unos aductos que se purifican fácilmente. Un importante factor que asegura una síntesis de alto rendimiento es el paso de encasquetado - la acetilación de bases no copuladas en el grupo 5'-hidroxilo. La mezcla de reacción en bruto recogida al final de cada síntesis, consta del aducto deseado, juntamente con pequeñas cantidades de productos secundarios. Este margen de secuencias de delección oscila en tamaño, desde una base hasta n-1 bases - en donde n es el número de bases en el producto deseado. Las secuencias de delección, las cuales se han formado debido a las copulaciones falladas, deben ser químicamente encasquetadas antes de las subsiguientes adiciones de bases. De otra manera, estas secuencias que faltan competirían con el aducto de longitud completa de las fosforamiditas. También, la separación del (n-1)-mero del producto deseado es mucho más estimulante que la separación de otras secuencias truncadas de corta longitud.

Los oligonucleótidos nacientes tienen las posiciones 5'-hidroxilo protegidas por grupos dimetoxitritilo (DMT), los cuales han de ser eliminados después de cada ciclo de síntesis con el fin de generar un grupo 5' OH reactivo de la cadena naciente de oligonucleótidos. Para producir los nucleótidos, el grupo DMT puede eliminarse durante la síntesis (TRITYL OFF) ("síntesis sin el tritilo") o puede dejarse (TRITYL ON) ("síntesis con el tritilo") si la HPLC de fase inversa es el método de purificación elegido. Se crea un grupo 3'-hidroxilo cuando el oligonucleótido sintetizado se escinde del soporte, por lo cual no es necesaria ninguna desprotección más.

Los inventores de la presente invención descubrieron sorprendentemente que las sondas de hibridación que tienen un bastón molecular interno poseen un comportamiento alterable y más predecible en los experimentos de análisis de la curva de fusión. Por lo tanto, en una importante versión de la presente invención, el bastón molecular conecta una primera parte y una segunda parte de una cadena de oligonucleótidos, en donde dicho oligonucleótido es una sonda Taqman, un faro molecular o un miembro de un par de sondas de hibridación FRET, caracterizado porque el bastón molecular conecta covalentemente el extremo 3' de un primer radical nucleótido, siendo dicho radical el radical terminal 3' de dicha primera parte de dicha cadena, con el extremo 5' de un segundo radical nucleótido, siendo dicho segundo radical nucleótido el terminal 5' de dicha segunda parte de dicha cadena.

Existe una fácil posibilidad de generar oligonucleótidos que tienen un bastón molecular axial interno. Una fosforamidita apropiada que contiene un bastón molecular axial puede ser introducida llevando un grupo hidroxilo apropiadamente protegido, el cual durante el siguiente ciclo de síntesis puede ser desprotegido de manera que puede reaccionar con otro desoxinucleótido-fosforamidita.

Un ejemplo para la síntesis de un fenileno fosforamidita viene dado en la figura 1 y el ejemplo 1. Otros bastones moleculares fosforamiditas pueden sintetizarse correspondientemente, partiendo de estructuras de bastón que tienen por ejemplo dos grupos hidroxilo como grupos reactivos.

En otra versión, varios bastones llevando fosforamiditas pueden copularse a la cadena de nucleótidos nacientes uno después de otro con el fin de generar un oligonucleótido que tiene un bastón interno de longitud apropiada.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a composiciones que contienen por lo menos un oligonucleótido con bastones moleculares axiales internos como se ha descrito más arriba.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende un oligonucleótido como se ha descrito más arriba.

ES 2 305 652 T3

En general, los oligonucleótidos que contienen bastones moleculares axiales pueden emplearse para una variedad de aplicaciones, por ejemplo, como cebador para una reacción de extensión de cebadores, como cebador para una reacción de amplificación de un ácido nucleico, o como una sonda de hibridación.

5 Los bastones moleculares axiales pueden servir como engarces de oligonucleótidos marcados entre la cadena de oligonucleótidos y la entidad marcadora. Como consecuencia, la estructura rígida del bastón da como resultado la prevención de una parcial vecindad entre la entidad marcadora y la cadena de oligonucleótido. En caso de que la marca sea una entidad fluorescente, dicha evitación es altamente ventajosa, dado que el indeseado efecto de extinción debido a una incontrolable interacción entre los radicales G y la entidad fluorescente no es posible.

10 En otra versión importante, los oligonucleótidos que contienen bastones moleculares axiales internos de acuerdo con la invención, se emplean como sondas de hibridación. Los bastones moleculares axiales son parte integral de sondas de hibridación tales como p. ej. sondas TaqMan, faros moleculares o pueden ser parte integral de uno o ambos miembros de un par de sondas de hibridación FRET. Dichas sondas de hibridación de acuerdo con la invención, pueden emplearse para la hibridación en blots, placas de microtitulación, micromatrices, y en particular para PCR a tiempo real.

15 En una versión específica, empleando una sonda de hibridación o un par de sondas de hibridación FRET de acuerdo con la invención, se monitoriza la dependencia a la temperatura de la hibridación, por ejemplo, por medio de la realización del análisis de la curva de fusión.

20 El análisis de la curva de fusión de la PCR a tiempo real, se efectúa habitualmente una vez completada la reacción PCR. Después de un paso inicial de desnaturalización y enfriamiento, la temperatura del amplicón se aumenta gradualmente, y la fluorescencia es detectable en tanto la sonda de hibridación está unida al ADN diana. En el caso del formato de la sonda de hibridación FRET, ambas sondas necesitan permanecer hibridadas al ácido nucleico diana con el fin de generar una señal fluorescente. A la temperatura de fusión, las sondas de hibridación (en el caso de formato FRET: por lo menos un miembro de dicho par de sondas de hibridación), se liberan a partir de su diana y la señal de fluorescencia va disminuyendo inmediatamente hasta el nivel original.

30 Esta disminución se monitoriza mediante una gráfica de la fluorescencia frente a la temperatura-tiempo, de manera que puede determinarse el valor de la primera derivada, a la cual se observa la máxima disminución de la fluorescencia. Como se demostrará en el ejemplo de más adelante, los oligonucleótidos que contienen bastones moleculares axiales internos de acuerdo con la invención, serán altamente ventajosos para esta versión particular.

35 Debido a la naturaleza rígida del bastón molecular axial, las características de fusión de un oligonucleótido pueden alterarse substancialmente y así ajustarse a las condiciones requeridas.

40 En primer lugar, la introducción de un bastón molecular interno puede dar como resultado un moderado desplazamiento de la temperatura de fusión T_m del oligonucleótido, el cual consiste habitualmente en un moderado descenso de la temperatura. Dicho descenso puede ser ventajoso especialmente para métodos de curva de fusión multiplex en donde tienen que analizarse múltiples T_m y discriminarse entre sí.

45 En segundo lugar, la introducción de un bastón molecular interno da como resultado un aumento en la diferencia de las temperaturas de fusión, detectable cuando se comparan las hibridaciones con y sin emparejamientos de pares de bases. Por lo tanto, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, mejoran significativamente la discriminación alélica y el análisis del polimorfismo de nucleótidos individuales en PCR a tiempo real así como también en versiones empleando soportes sólidos.

50 En tercer lugar, la introducción de un bastón molecular interno en todos los casos investigados hasta la fecha, da como resultado unos puntos de fusión puntiagudos, delgados y óptimamente bien formados, cuando se obtiene la primera derivada de la gráfica de la temperatura frente al tiempo. Esto podría explicarse por la naturaleza rígida de los bastones moleculares axiales, lo cual da por resultado una situación en donde la respectiva sonda de hibridación está todavía o bien completamente hibridada al ADN diana, o bien está completamente libre en su forma monocatenaria en la solución de reacción. En otras palabras: se evitan parcialmente los intermediarios de la hibridación que dan como resultado, curvas de fusión con deformaciones.

55 En cuarto lugar, el empleo de sondas que contienen bastones moleculares axiales internos da como resultado en muchos casos, un aumento de la especificidad del ensayo.

60 Los oligonucleótidos que contienen un bastón molecular axial pueden también inmovilizarse sobre un soporte sólido, por ejemplo, una micromatriz de ácidos nucleicos. De preferencia es el bastón molecular el que conecta la cadena de radicales nucleótidos al soporte sólido. Esta aplicación es altamente ventajosa debido a que la rígida estructura de los bastones conduce a una separación espacial limitada, definida y controlable entre el propio oligonucleótido y el soporte sólido. Como consecuencia, se evita un presumible obstáculo estérico de la hibridación al oligonucleótido inmovilizado, causado por la vecindad al soporte sólido.

65 Dado que para aplicaciones de matrices de ácidos nucleicos es particularmente importante conseguir una discriminación emparejado/desemparejado óptima, la introducción de un bastón molecular interno de acuerdo con la

ES 2 305 652 T3

invención, es altamente ventajosa, debido a que da como resultado un aumento de la diferencia de temperaturas de fusión, detectable cuando se comparan las hibridaciones con y sin los desemparejamientos de los pares de bases.

5 El modo de copulación apropiado del bastón molecular sobre el soporte sólido depende del tipo de soporte sólido que se empleará realmente. Por ejemplo, los grupos amino del bastón pueden reaccionar con grupos epoxi sobre la superficie como por ejemplo, de vidrio o plástico. Alternativamente, pueden copularse bastones alcoxisilanos a superficies de vidrio. Para superficies que llevan grupos C-OH, la unión puede obtenerse empleando la química convencional de la fosforamidita.

10 Con el fin de controlar la densidad de los oligonucleótidos inmovilizados mediante síntesis *in situ* sobre soporte sólido, el soporte sólido se hace reaccionar en un primer paso con una solución mezcla de bastones moleculares axiales extensibles mediante síntesis de oligonucleótidos y bastones moleculares axiales no extensibles. La densidad puede ajustarse a continuación rectificando la concentración de los compuestos de bastones no extensibles.

15 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1

Síntesis de una fosforamidita que comprende un bastón molecular

20 La figura representa la estrategia de síntesis para la generación de una fosforamidita que comprende un bastón molecular, el cual de acuerdo con la invención puede ser incorporado internamente en un oligonucleótido mediante la química convencional de síntesis de oligonucleótidos. Los detalles están descritos en el ejemplo 1.

25 Figura 2

Análisis de mutación de la protrombina

30 Se amplificó 1 ng de protrombina homocigótica tipo salvaje, ADN de plásmido mutante heterocigótico y homocigótico. La sonda de hibridación que se extendía sobre el sitio de la mutación (sonda de mutación) tenía el 100% de homología al ADN del plásmido tipo salvaje homocigótico.

35 Figura 3

Análisis de la mutación de protrombina con un desemparejamiento artificial

40 Se amplificó 1 ng de protrombina homocigótica tipo salvaje, ADN de plásmido mutante heterocigótico y homocigótico. La sonda de hibridación que se extendía sobre el sitio de la mutación (sonda de mutación) llevaba un desemparejamiento artificial.

45 Figura 4

Análisis de la mutación de protrombina con el engarce fenileno insertado

50 Se amplificó 1 ng de protrombina homocigótica tipo salvaje, ADN de plásmido mutante heterocigótico y homocigótico. La sonda de hibridación que se extendía sobre el sitio de la mutación (sonda de mutación) llevaba un engarce fenileno insertado.

Figura 5

55 *Análisis de la mutación de protrombina: desplazamiento de la T_M de los picos de fusión empleando sondas de mutación modificadas*

60 Se amplificó 1 ng del ADN de plásmido mutante homocigótico de protrombina. Se ensayaron tres diferentes sondas de mutación: una con el 100% de homología al ADN del plásmido tipo salvaje homocigótico, una con un desemparejamiento artificial y una con un engarce de fenileno insertado.

Figura 6

65 *Detección del EBV con un emparejamiento perfecto de las sondas de hibridación*

Se amplificaron 10⁴ copias del ADN del plásmido EBV. La sonda de hibridación marcada con LC rojo 640, la cual determinó la T_M, mostró un 100% de homología con el ADN del plásmido EBV.

ES 2 305 652 T3

Figura 7

Detección del EBV con sondas de hibridación que llevan un engarce fenileno insertado

5 Se amplificaron 10^4 copias del ADN del plásmido EBV. La sonda de hibridación marcada con LC rojo 640, la cual determinó la T_M , llevaba un fenileno insertado.

10 Los siguientes ejemplos, referencias, listados de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero ámbito está descrito en las reivindicaciones del apéndice.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Síntesis de un oligonucleótido que contiene un bastón molecular

20 Como ejemplo para la síntesis de un oligonucleótido de acuerdo con la invención, se sintetizó un oligonucleótido de acuerdo con la invención llevando un bastón interno, de acuerdo con la estrategia representada en la figura 1 como sigue:

A) *Alcohol 4-(p,p'-dimetoxitritil-metiloxi)bencílico*

25 En el espacio de 1 hora, se añadió gota a gota una solución de 51,5 g de cloruro de dimetoxitritilo en 300 ml de piridina anhidra, a temperatura ambiente, a una solución de 20 g de 1,4 bishidroximetilbenceno en 100 ml de piridina anhidra. Después de agitar durante toda la noche, se evaporó el disolvente empleando un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en 800 ml de éster etílico del ácido acético y se lavó una vez con 400 ml y a continuación dos veces
30 con 200 ml de agua. La fase orgánica se separó y se secó con sulfato de sodio. Después de la filtración se eliminó el disolvente empleando un evaporador rotativo.

35 La purificación se efectuó mediante una columna cromatográfica sobre sílica gel. Por lo tanto se disolvieron 10 gramos del producto en bruto en una mezcla tolueno/éster etílico del ácido acético/metanol 4:1:1 conteniendo 0,1% de trietilamina. La solución se aplicó sobre una columna de 40 cm / d = 6,9 cm, rellena con sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm). El producto se eluyó con la mezcla tolueno / éster etílico del ácido acético / metanol 4:1:1 conteniendo 0,1% de trietilamina.

40 TLC: mezcla tolueno / éster etílico del ácido acético / metanol 4:1:1 conteniendo 0,1% de trietilamina, Rf: 0,56

B) *Éster 4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoxi]-bencílico y éster 2-ciano-etílico del ácido diisopropil-fosforamídico.*

45 A temperatura ambiente y en atmósfera de argón, se añadieron 0,78 gramos de tetrazolido de diisopropilamonio a una solución de 2 gramos de 1-(O-dimetoxitritil-hidroximetil) 4-hidroximetilbenceno en 15 ml de cloruro de metileno anhidro. Una solución de 1,37 g de 2-cianoetil-tetra isopropil-fosfordiamidita en 10 ml de cloruro de metileno anhidro, se añadió gota a gota en el intervalo de 30 minutos. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas se filtró la suspensión. Se eliminó el disolvente del filtrado empleando un evaporador rotativo. El residuo se disolvió en 50 ml
50 de éster etílico del ácido acético y se lavó dos veces con 10 ml de solución acuosa al 5% de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se separó y se secó con sulfato de sodio. Después de la filtración se eliminó el disolvente empleando un evaporador rotativo.

55 La purificación se efectuó en una columna cromatográfica sobre sílica gel. Por lo tanto, el producto en bruto se disolvió en una mezcla de éster etílico del ácido acético / hexano 1 : 1 conteniendo un 0,1% de trietilamina. La solución se aplicó sobre una columna cromatográfica con l = 32 cm / d = 4,5 cm, rellena de sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm). El producto se eluyó con una mezcla de éster etílico del ácido acético / hexano 1 : 1 conteniendo un 0,1% de trietilamina.

TLC: Mezcla de éster etílico del ácido acético / hexano conteniendo un 0,1% de trietilamina. Rf: 0,80.

60 RMN H^1 (300 MHz): 1,21 t [12H], 2,76 t [2H], 3,7 m [2H], 3,78 s [6H], 3,88 m [2H], 4,16 s [2H], 4,75 m [2H], 6,91 d [4]7,23-7,67 m,s [13] RMN P^{31} (300 MHz): 149,19.

65 El fosforamidato resultante se incorporó a los oligonucleótidos de la síntesis convencional de oligonucleótidos empleando la química del fosforamidato. El bastón molecular del oligonucleótido sintetizado más arriba se abrevia con el nombre de "engarce de fenileno" en los ejemplos que siguen.

ES 2 305 652 T3

Ejemplo 2

Análisis de la mutación a tiempo real del ADN del plásmido de protrombina

5 Para demostrar la validez de la invención, se escogió la formación de los genotipos de la mutación del punto de protrombina (G20210A) empleando las sondas de hibridación como sistema de ensayo.

10 Se clonaron fragmentos parciales de tipo salvaje y la secuencia mutante de protrombina en vectores separados del plásmido pCRTM 2,1 (Invitrogen). La concentración del ADN del plásmido se determinó mediante espectrofotometría. Se prepararon diluciones del ADN del plásmido de protrombina y mezclas del tipo salvaje y el plásmido mutante para obtener un ADN heterocigótico, empleando un diluyente consistente en MS2 ARN (10 ng/ μ l) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3.

15 La PCR se efectuó sobre un aparato LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Un ensayo típico de PCR consta de 2 μ l de ADN, 1 x mezcla de detección, 1 x tampón de reacción, 4 mM de cloruro de magnesio y 1,6 unidades de Taq polimerasa (todo de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), completando con agua hasta un volumen de 20 μ l en una reacción capilar.

20 Para un análisis de mutación, se empleó el tampón de reacción y el Taq polimerasa sin modificar del LightCycler - kit master de sondas de hibridación de ADN (Roche Molecular Biochemical, n° de catálogo 2 015 102).

25 Las mezclas 10 x de detección para la protrombina estaban formadas por 5 μ M de cada cebador (delantero e inverso), 2 μ M de sonda de mutación (marcada con fluoresceína), 4 μ M de sonda de anclaje (marcada con LC rojo 640), 0,05% de Brij-35 en 10 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,3.

Se emplearon las siguientes secuencias del cebador y sonda de hibridación:

Cebador delantero de protrombina:

30 5'CCAATCCCGTGAAAGAATTAT-3' (Seq. Id. No: 1)

Cebador inverso de protrombina:

35 5'-AGGTGGTGGATTCTTAAGTC-3' (Seq. Id. No: 2)

Sonda de protrombina 1:

40 5'-LCRed640-CACTTTTATTGGGAACCATAGTTTTAGAAACACAA-fosfato-3' (Seq. Id. No: 3)

Sonda de protrombina 2:

45 5'-GCATTGAGGCTCGCTGAGAG-fluoresceína-3' (Seq. Id. No: 4)

Sonda de protrombina 3:

50 5'-GCATTGTGGCTCGCTGAGAG-fluoresceína-3' (Seq. Id. No: 5)

Sonda de protrombina 4:

55 5'- GCATTGxGGCTCGCTGAGAG-fluoresceína-3' (Seq. Id. No: 6)

x = engarce de fenileno

60 Las condiciones regulares del ciclado de la PCR consistieron en una incubación inicial a 95°C durante 30 segundos seguido de 45 ciclos de 95°C durante 0 segundos, 55°C durante 10 segundos y 72°C durante 5 segundos, finalizando con 40°C durante 30 segundos.

65 Las temperaturas de fusión de cada reacción se determinaron mediante el programa del análisis Light Cycler empleando el método de cálculo polinómico mediante substracción del valor de fondo original.

ES 2 305 652 T3

Ejemplo 3

La obtención del genotipo de la mutación del punto de protrombina (G20210A) no es posible con la sonda de mutación de emparejamiento perfecto

5 Se efectuó la PCR a tiempo real de 1 ng del ADN de protrombina de tipo salvaje heterocigótico y mutante en un ajuste de acuerdo con el ejemplo 1. Los resultados están mostrados en la figura 2. Como puede verse, después de realizar un análisis de la curva de fusión con una sonda de mutación de emparejamiento perfecto, no es posible determinar el genotipo de protrombina exactamente, puesto que el tipo salvaje homocigótico y el genotipo heterocigótico
10 no pueden diferenciarse exactamente.

Ejemplo 4

15 *Empleando una sonda de mutación con un emparejamiento artificial es posible la obtención del genotipo de la mutación del punto de protrombina (G20210A), pero no es perfecta*

Se efectuó la PCR a tiempo real de 1 ng del ADN de protrombina de tipo salvaje heterocigótico y mutante en un ajuste de acuerdo con el ejemplo 1. Los resultados están mostrados en la figura 3. Como puede verse, la correcta
20 determinación del genotipo de protrombina es principalmente posible empleando la sonda de mutación con un emparejamiento artificial, pero el pico de fusión del tipo salvaje es todavía muy ancho y muestra unas deformaciones bien visibles. Adicionalmente, el mínimo entre los dos picos de fusión de las muestras heterocigóticas tienen un alto nivel de la señal, de manera que no hay una gran diferencia entre el mínimo entre los picos y el máximo del pico de fusión
25 del tipo salvaje.

Ejemplo 5

30 *La obtención del genotipo perfecto de la mutación del punto de protrombina (G20210A) puede efectuarse empleando una sonda de mutación con un engarce de fenileno insertado*

Se efectuó la PCR a tiempo real de 1 ng del ADN de protrombina de tipo salvaje heterocigótico y mutante en un ajuste de acuerdo con el ejemplo 1. Los resultados están mostrados en la figura 4. Como puede verse, el genotipo de
35 protrombina puede determinarse perfectamente empleando la sonda de mutación con un engarce de fenileno insertado. Todos los picos de fusión son muy puntiagudos y sin deformaciones.

Ejemplo 6

40 *Desviación de la temperatura de fusión del pico de fusión de la mutación de protrombina empleando diferentes sondas de mutación*

Se efectuó la PCR a tiempo real de 1 ng del ADN de protrombina mutante en un ajuste de acuerdo con el ejemplo
45 1. Los resultados están mostrados en la figura 5. Como puede verse, la temperatura de fusión del pico de fusión de la mutación de protrombina se desvía en función de la sonda de mutación empleada. La tabla que sigue a continuación muestra las diferentes temperaturas de fusión.

	T_M (°C)	ΔT_M (°C)
Sonda de mutación con un emparejamiento perfecto	57,80	5,67
Sonda de mutación con un desemparejamiento artificial	52,13	
Sonda de mutación con un engarce Hauber insertado	46,28	5,85

ES 2 305 652 T3

Ejemplo 7

PCR a tiempo real del ADN del plásmido EBV

5 Para demostrar la validez de la invención, se escogió el virus Epstein-Barr, designado habitualmente como EBV, un miembro de la familia de los herpes virus y uno de los virus humanos más comunes, como segundo sistema de ensayo.

10 Se clonó un fragmento parcial de EBV en el vector plásmido pT3T7 (Roche Molecular Biochemicals). Los números de copias del ADN del plásmido se determinaron mediante espectrofotometría aceptando que 1 mol es equivalente a 6×10^{23} copias. Se prepararon diluciones del ADN del plásmido EBV empleando un diluyente consistente en MS2 ARN (10 ng/ μ l) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3.

15 Se efectuó la PCR con un instrumento LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Un ensayo típico de PCR constaba de 5 μ l de ADN, 1 x mezcla de detección 1 x de tampón de reacción, 3,5 mM de cloruro de magnesio y 1,6 unidades de Taq polimerasa modificada (todos de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), completando con agua hasta un volumen de 20 μ l en una reacción de capilaridad.

20 Para la PCR, se emplearon el tampón de reacción y la Taq polimerasa modificada del kit master de sondas de hibridación Fast Start ADN del LightCycler (Roche Molecular Biochemical, n° de catálogo 3003 248).

Las mezclas de detección 10 x para el EBV constaron de 5 μ M de cada cebador (delantero e inverso), 2 μ M de cada una de las sondas de hibridación (marcadas con fluoresceína y LC rojo 640)), 0,05% de Brij-35 en 10 mM de tampón de Tris-HCl, pH 8,3.

25 Se emplearon las siguientes secuencias del cebador y las sondas de hibridación:

Cebador delantero del EBV:

30 5'-ATGAGGAACGTGAATCTAATGA-3' (Seq. Id. No: 7)

Cebador inverso del EBV:

35 5'-TACAGATAGATGGCACTCTTACCTT-3' (Seq. Id. No: 8)

Sonda EBV 1:

40 5'-GGGATTGCAACACGACGGGAATGACG-fluoresceína-3' (Seq. Id. No: 9)

Sonda EBV 2:

45 5'-LCRed640-GCTCCCTCCCCCTCCCTACTCTC-fosfato-3' (Seq. Id. No: 10)

Sonda EBV 3:

50 5'-LCRed640-GCTCCCTCCCCCTC_xCTACTCTC-fosfato-3' (Seq. Id. No: 11)

x = engarce de fenileno

55 Las condiciones regulares para la ciclación de la PCR consistieron en una incubación inicial a 95°C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, a 55°C durante 15 segundos y a 72°C durante 15 segundos finalizando con 40°C durante 30 segundos.

60 Las temperaturas de fusión para cada reacción, se determinaron mediante el programa de análisis LightCycler empleando un método de cálculo polinómico con substracción del valor del fondo original.

65

ES 2 305 652 T3

Ejemplo 8

Se genera un doble pico de fusión con sondas de hibridación con un emparejamiento perfecto

5 Se efectuó una PCR a tiempo real de 10^4 copias de EBV en un ajuste de acuerdo con el ejemplo 6. Los resultados están mostrados en la figura 6. Como puede verse, la realización de un análisis de una curva de fusión con sondas de hibridación con un emparejamiento perfecto, generó un pico doble y no un pico de fusión único, como se esperaba.

10 Ejemplo 9

Empleando la sonda de hibridación, se generó un pico de fusión único con un engarce insertado de fenileno

15 Se efectuaron 10^4 copias de EBV con una PCR a tiempo real, en un ajuste de acuerdo con el ejemplo 6. Los resultados se muestran en la figura 6. Como puede verse, si la sonda de hibridación, la cual determina la T_M , lleva insertado un engarce de fenileno, se genera el pico de fusión sencillo esperado, después de realizar el análisis de la curva de fusión.

20 Listado de referencias

Bernard, P. S., et al., *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 101-107

Matthews, J.A., and Kricka, L.J., *Analytical Biochemistry* 169 (1988) 1-25

25 **Schwab et al.,** *In Chem. Rev.* 99 (1999) 1863-1938

US 5,118,801

30 US 5,141,837

US 5,210,015

US 5,290,925

35 US 5,487,972

US 5,538,848

40 US 5,804,375

US 6,174,670

WO 97/45707

45 WO 97/46711

WO 97/46712

50 WO 97/46714

55

60

65

ES 2 305 652 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para la síntesis de un oligonucleótido que contiene un bastón molecular axial interno, siendo dicho bastón molecular una estructura rígida la cual no puede ser torcida en sí misma, el cual método comprende:

- suministro de una partícula de vidrio de poro controlado
- síntesis de dicho oligonucleótido por medio de la química de la fosforamidita,

10 en donde dicho bastón molecular axial está incorporado en dicho oligonucleótido mediante el suministro de una fosforamidita que comprende un bastón molecular axial,

15 en donde dicho oligonucleótido es una sonda TaqMan, un faro molecular o un miembro de un par de sondas de hibridación FRET.

20 2. Empleo de un oligonucleótido que contiene un bastón molecular axial interno, siendo dicho bastón molecular una estructura rígida la cual no puede ser torcida en sí misma, como una sonda de hibridación, en donde la dependencia de la hibridación a la temperatura se monitoriza en tiempo real, en donde dicho oligonucleótido es un faro molecular o un miembro de un par de sondas de hibridación FRET.

25 3. Composición que comprende un oligonucleótido que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1.

30 4. Kit que contiene un oligonucleótido que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1.

35

40

45

50

55

60

65

70

Fig. 1

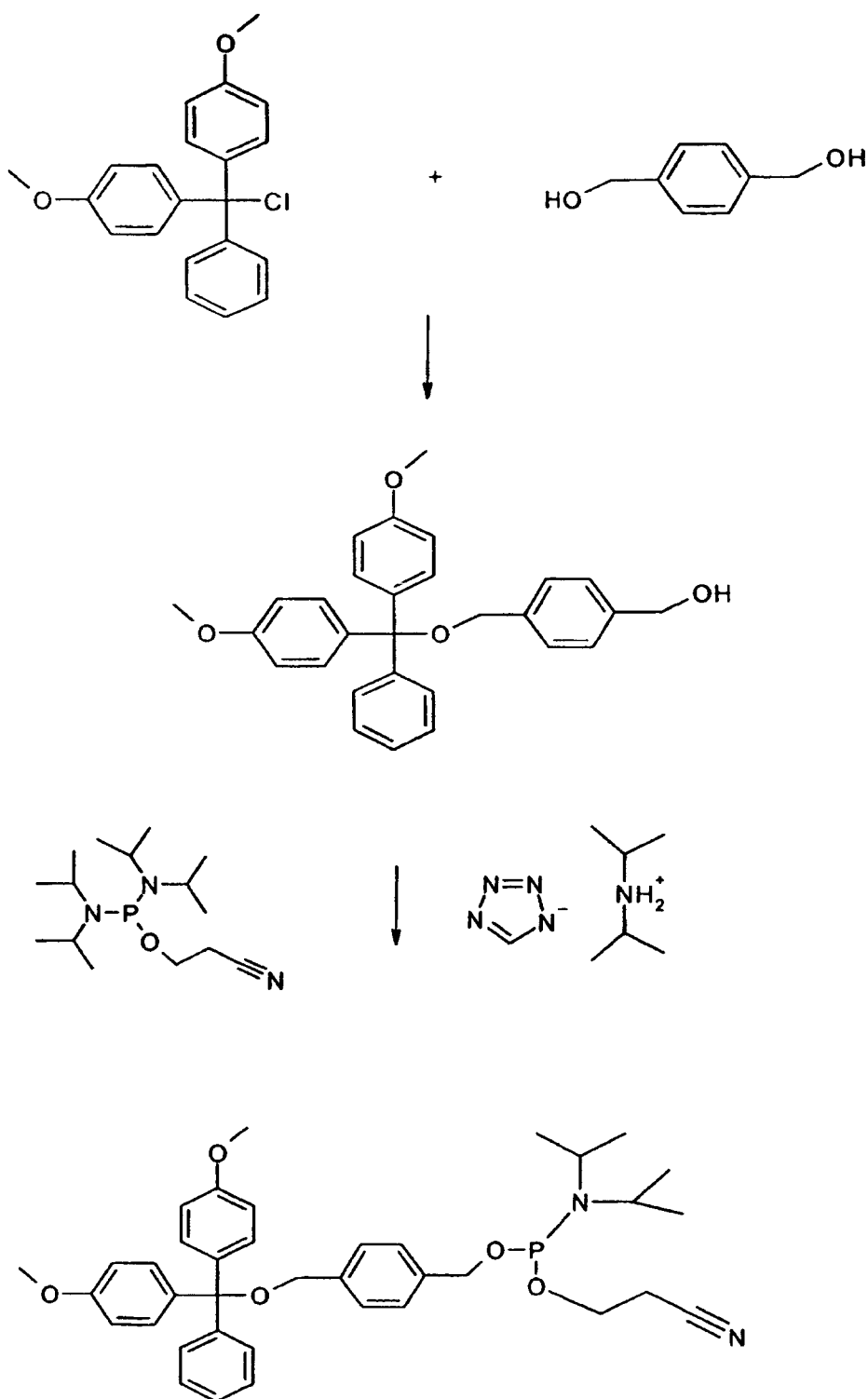
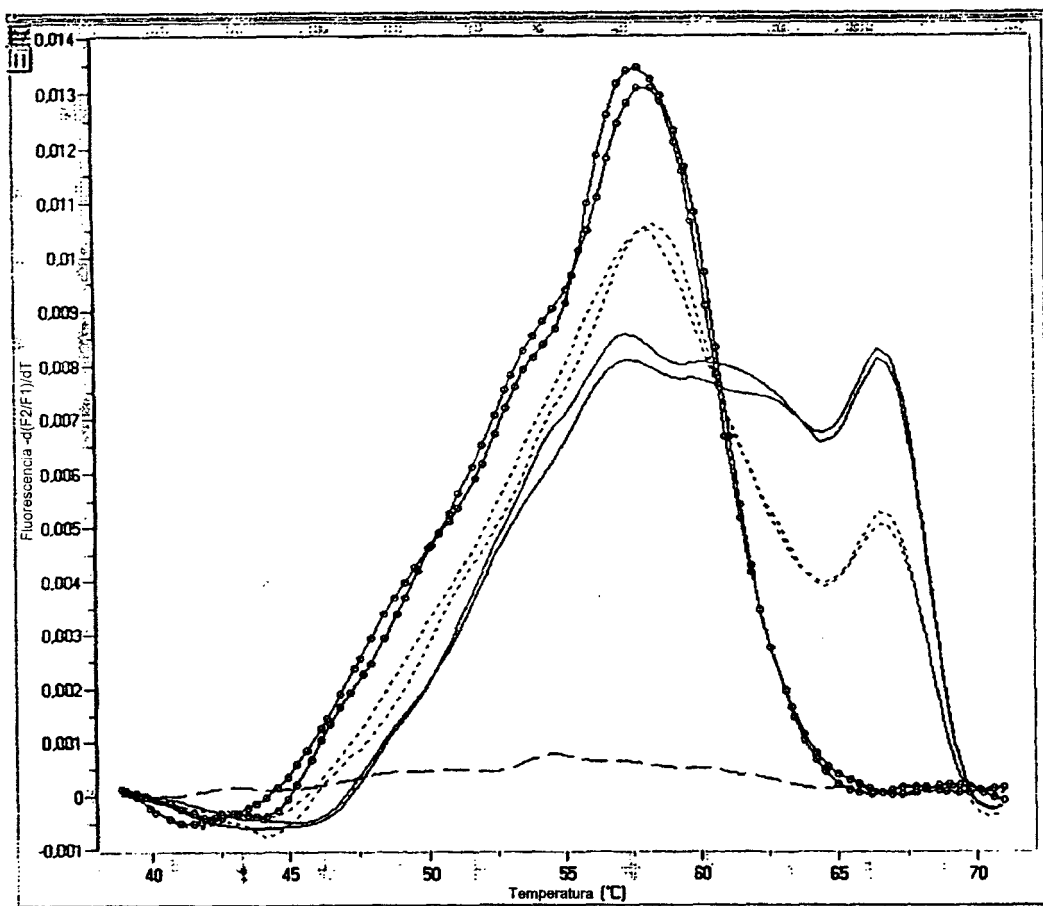
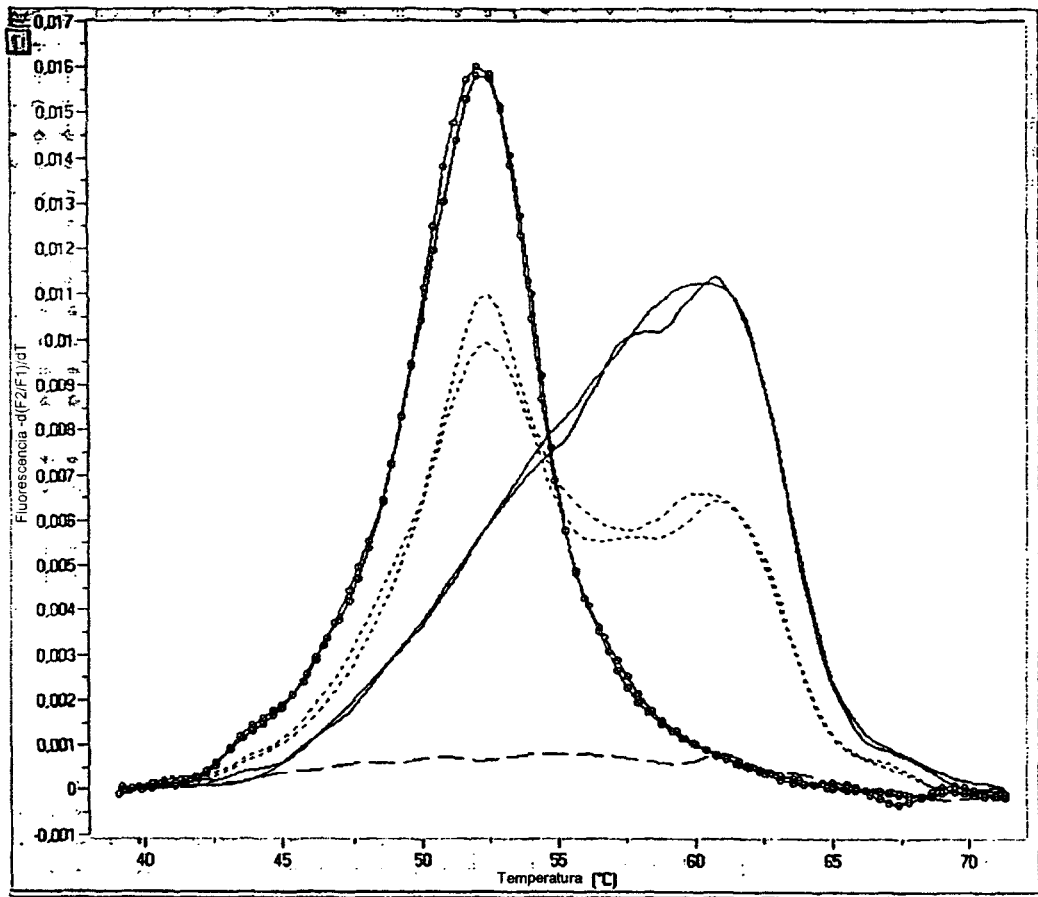


Fig. 2



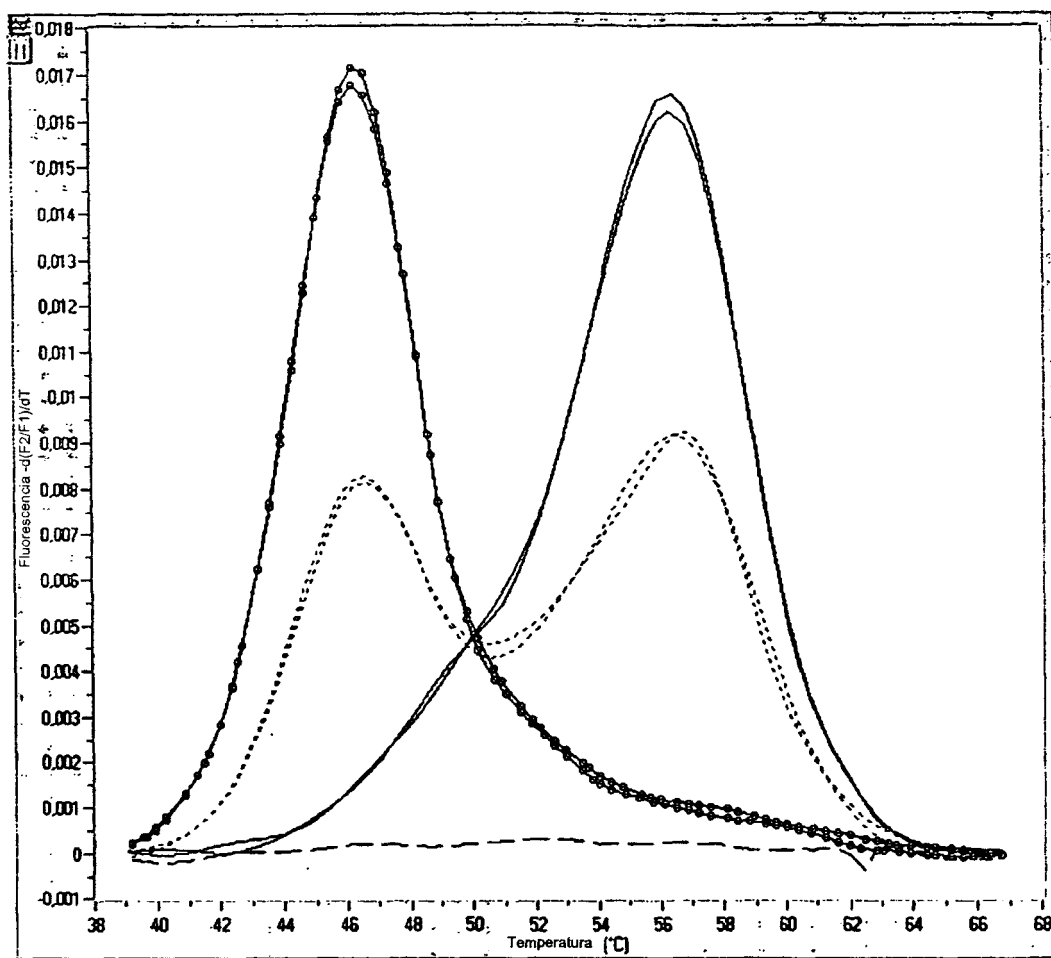
- tipo salvaje homocigótico
- - - heterocigótico
- mutante homocigótico
- - control negativo

Fig. 3



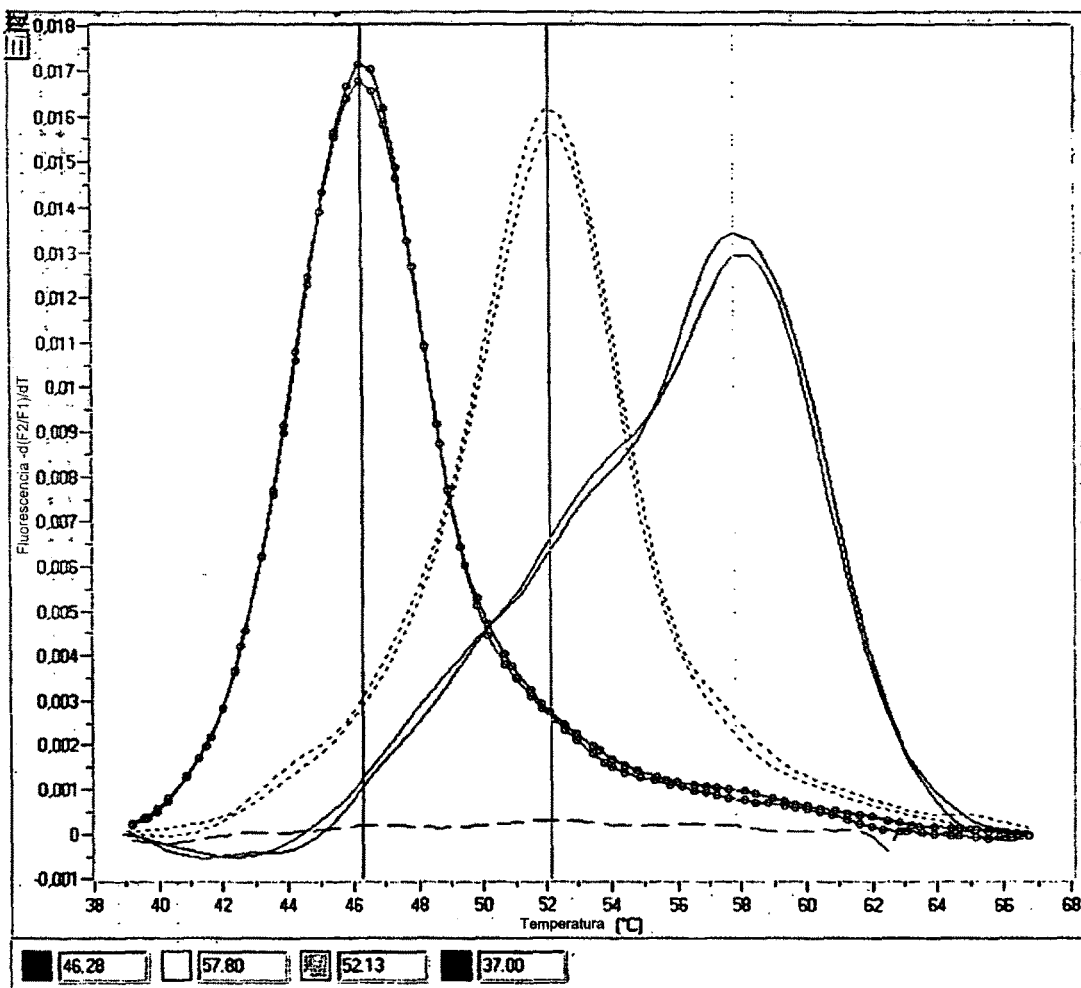
- tipo salvaje homocigótico
- - - heterocigótico
- mutante homocigótico
- - - control negativo

Fig. 4



- tipo salvaje homocigótico
- - - heterocigótico
- — mutante homocigótico
- - - control negativo

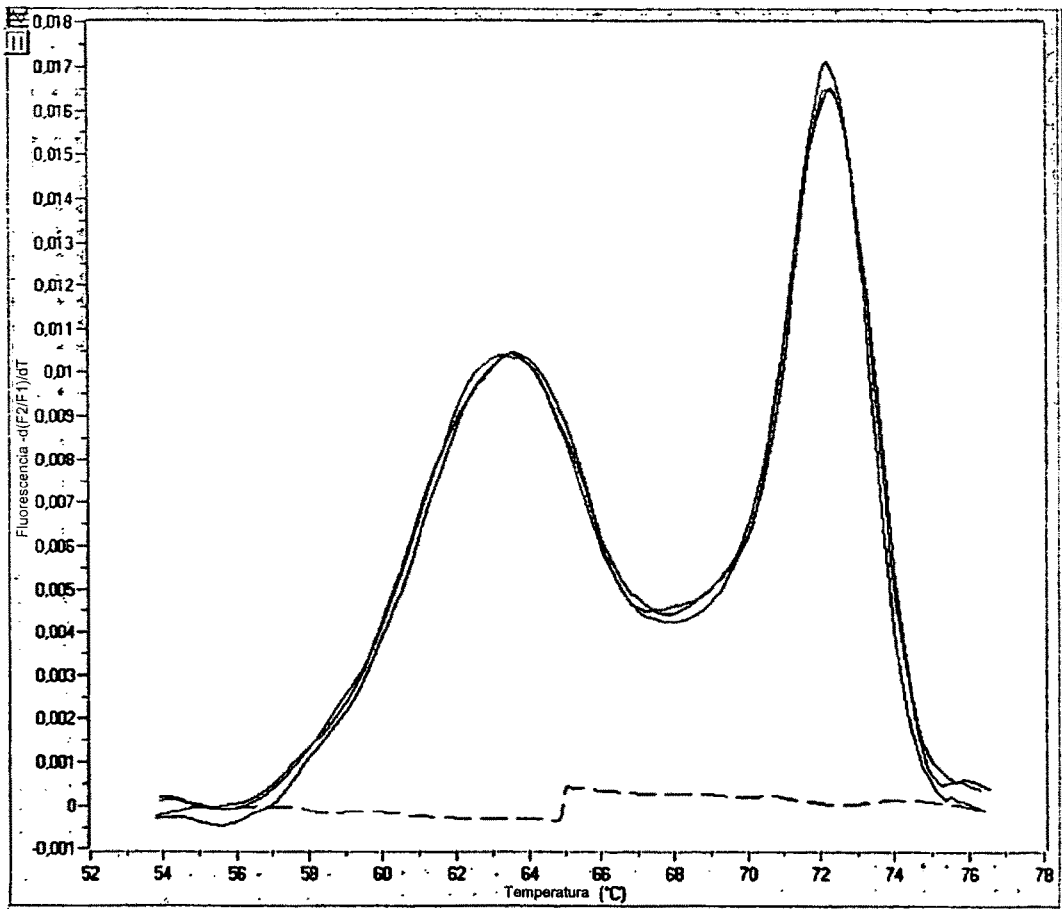
Fig. 5



T_M

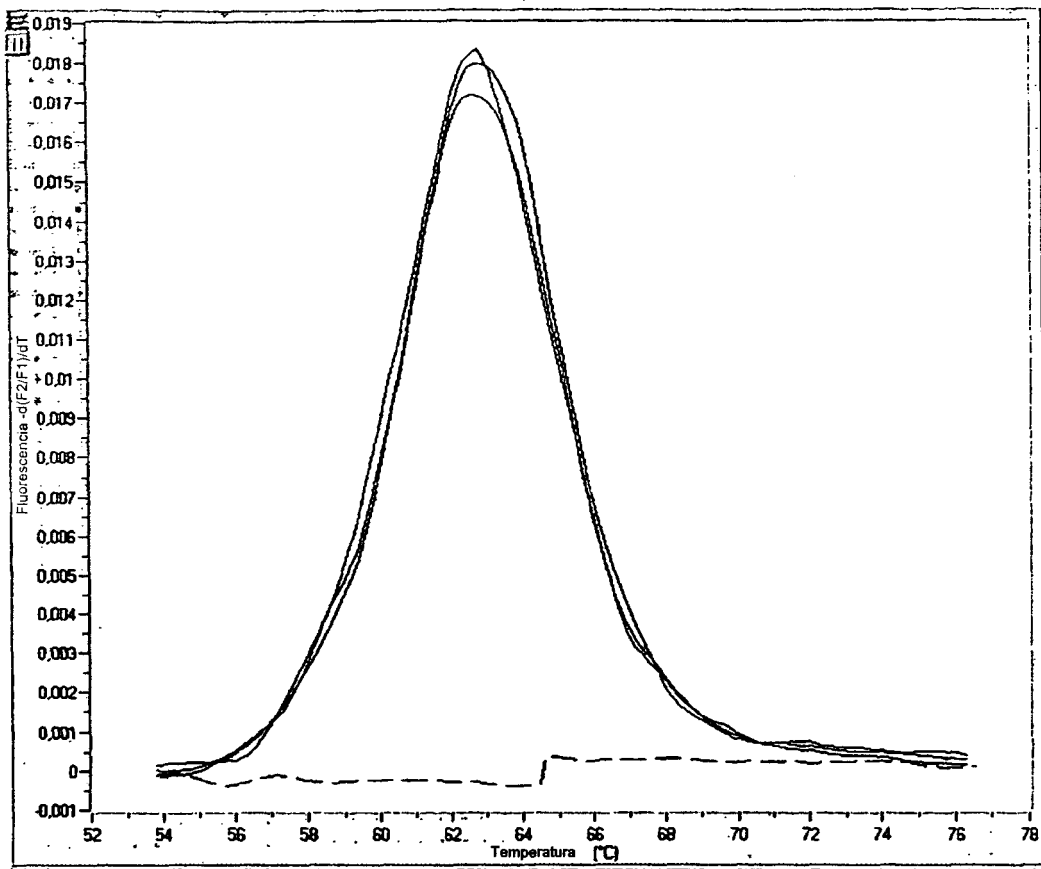
- emparejamiento perfecto 57,80 °C
- desemparejamiento adicional 52,13 °C
- engarce de fenileno 46,28 °C
- - - control negativo

Fig. 6



- 10^4 copias de EBV
- - control negativo

Fig. 7



- 10^4 copias de EBV
- - control negativo

ES 2 305 652 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG	
5	<120> Oligonucleótidos que contienen bastones moleculares	
	<130> 22320 EP1	
	<150> EP 03027753	
10	<151> 2003-12-02	
	<160> 11	
	<170> PatentIn version 3.2	
	<210> 1	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador delantero de protrombina	
	<400> 1	
25	ccaatcccgt gaaagaatta t	21
	<210> 2	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de protrombina	
	<400> 2	
40	agtggtgga ttcttaagtc	20
	<210> 3	
	<211> 35	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda de protombina 1	
50	<400> 3	
	cactttatt gggaaccata gtttagaaa cacaa	35
55	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda de protrombina 2	
65		

ES 2 305 652 T3

	<400> 4	
	gcattgaggc tcgctgagag	20
5	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda de protrombina 3	
15	<400> 5	
	gcattgtggc tcgctgagag	20
20	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> sonda de protrombina 4	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<223> n en la posición 7 significa un engarce de fenileno	
	<400> 6	
35	gcattgnggc tcgctgagag	20
	<210> 7	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador delantero de EBV	
	<400> 7	
50	atgaggaacg tgaatctaata ga	22
	<210> 8	
	<211> 25	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> cebador inverso de EBV	
	<400> 8	
65	tacagataga tggcactctt acctt	25
	<210> 9	

