



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 467**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97934169 .0**

(86) Fecha de presentación : **15.07.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0912767**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.1999**

(54) Título: **Métodos para detectar y amplificar secuencias de ácido nucleico utilizando oligonucleótidos modificados que tienen una T_m específica de la diana más elevada.**

(30) Prioridad: **16.07.1996 US 21818 P**

(73) Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**
10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(72) Inventor/es: **Becker, Michael, McClellan y**
Majlessi, Mehrdad

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 270 467 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

Métodos para detectar y amplificar secuencias de ácido nucleico utilizando oligonucleótidos modificados que tienen una T_m específica de la diana más elevada.

Ámbito de la invención

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y amplificación de secuencias de ácidos nucleicos utilizando oligonucleótidos que contienen uno o más nucleótidos que presentan una o más modificaciones, lo que se traduce en una mayor afinidad por la diana. Como consecuencia, los métodos y composiciones de la presente invención ofrecen ventajas para las aplicaciones en las que se utiliza la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la realización de diagnósticos médicos y veterinarios, en la realización de pruebas de alimentos, y en medicina forense.

Antecedentes de la invención

En los años recientes, la hibridación de ácidos nucleicos se ha convertido en una forma cada vez más importante de identificar, medir y detectar la presencia de ácidos nucleicos concretos en una muestra determinada. Así, por ejemplo, los campos de los diagnósticos médicos, de la realización de pruebas de alimentos y medioambientales, y de la medicina forense, se han beneficiado del uso de la hibridación de ácidos nucleicos como forma rápida, sencilla y extraordinariamente exacta de probar la presencia o ausencia de contaminantes biológicos o microorganismos determinados en una muestra dada.

La mayoría de los esquemas de hibridación de ácidos nucleicos tienen características comunes. Una de estas características comunes es el uso de sondas de ácidos nucleicos de una sola cadena (o de sondas de doble cadena desnaturalizadas) que tienen una secuencia de nucleótidos conocida o claramente definida. Las moléculas sonda pueden obtenerse de fuentes biológicas, por ejemplo, ADN o ARN genómico, o pueden sintetizarse por medios enzimáticos (en una célula huésped procariótica o eucariótica, o bien, *in vitro*). Actualmente, la mayoría de las sondas de ácidos nucleicos que se usan comúnmente son sondas de oligonucleótidos que se crean mediante métodos de síntesis química ("oligonucleótidos sintéticos"). Uno de tales métodos de síntesis es la adición secuencial automatizada de nucleótidos protegidos, activados en su extremo 3', al extremo 5' de una cadena creciente de oligonucleótidos unidos a fase sólida; tras esta adición secuencial, se separa el oligonucleótido completado del soporte, y se lo desprotege. Véase, por ejemplo, Eckstein, *Oligonucleotides & Analogues: A Practical Approach* (1991).

Los oligonucleótidos sintéticos que se utilizan como sondas de hibridación suelen ser desoxirribonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que se desea detectar. Normalmente se prefieren los oligonucleótidos de ADN, por una serie de razones. Entre estas razones está la mayor estabilidad que tiene el ADN frente a la hidrólisis enzimática cuando es expuesto a muestras comunes, ya que en las muestras se da una presencia casi ubicua de diversas ARNasas. Además, se sabe que el ARN es menos estable químicamente que el ADN; por ejemplo, la degradación del ARN se ve facilitada por la presencia de metales pesados y bases. En comparación con el ARN, en las condiciones habituales de los ensayos (en el contexto del presente documento, por "ensayos" y "pruebas" se entiende los procedimientos que se llevan a cabo para la detección, el análisis, la determinación, etc., de o con materiales biológicos o sintéticos), el ADN es menos proclive a adoptar estructuras secundarias estables. La formación de dichas estructuras secundarias puede hacer que los oligonucleótidos dejen de estar disponibles para la hibridación intermolecular. Sin embargo, es posible utilizar oligonucleótidos de ARN, aunque se consideren menos preferibles.

La hibridación de ácidos nucleicos aprovecha la capacidad que los ácidos nucleicos monocatenarios (de una sola cadena) tienen para formar híbridos estables con las correspondientes regiones de cadenas de ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias. Habitualmente, dichos híbridos constan de dúplex de doble cadena, aunque también se ha observado la formación de estructuras de triple cadena. En general, las cadenas simples de ADN o de ARN se forman a partir de nucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), timidina (T), guanina (G), uracilo (U), o inosina (I). Las cadenas de una sola hélice pueden hibridarse, formando una estructura de doble cadena que queda unida por puentes de hidrógeno entre los pares de bases complementarias. Generalmente, A se une mediante puentes de hidrógeno a T o U, mientras que G o I se unen mediante puentes de hidrógeno a C. En las cadenas de doble hélice están presentes los clásicos pares de bases AT o AU, TA o UA, GC, o CG. También pueden estar presentes algunos pares de bases mal emparejadas, (por ejemplo, AG, GU). En las condiciones de hibridación apropiadas, pueden formarse híbridos ADN/ADN, ARN/ADN, o ARN/ARN.

"Complementarias" significa que las secuencias de nucleótidos de las regiones correspondientes de dos ácidos nucleicos monocatenarios, o dos regiones diferentes del mismo ácido nucleico monocatenario, tienen una composición de bases nucleotídicas que permite que las cadenas únicas se hibriden entre sí, formando una región de doble cadena estable, unida por puentes de hidrógeno, en condiciones de hibridación astringentes. Cuando una secuencia contigua de nucleótidos de una región monocatenaria es capaz de formar una serie de pares de bases unidas por puentes de hidrógeno "canónicos" con una secuencia de nucleótidos análoga a la otra región monocatenaria, de manera que A se empareje con U o T, y C se empareje con G, se considera que las secuencias de nucleótidos son "perfectamente" complementarias.

La enorme especificidad de la hibridación de ácidos nucleicos, que en algunas circunstancias puede permitir discriminar ácidos nucleicos que difieren entre sí en tan solo una base, ha posibilitado el desarrollo de ensayos, basados en la hibridación, para muestras que contengan microorganismos concretos, ácidos nucleicos que presenten determinados marcadores genéticos, tejidos, líquidos biológicos, y muestras similares. A menudo este tipo de ensayos son capaces de identificar ácidos nucleicos que pertenecen a especies concretas de microorganismos, en muestras que contienen también otras especies, estrechamente relacionadas con las que se desea identificar. Además, los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos son capaces de detectar o identificar, específicamente, a ciertos individuos, o grupos de individuos, dentro de una misma especie, como ocurre con el uso en medicina forense de las técnicas RLFP (siglas en inglés de “polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción”) y PCR (siglas en inglés de “reacción en cadena de la polimerasa”) para las pruebas con muestras de origen humano.

A menudo, el uso de los oligonucleótidos como herramienta de diagnóstico en los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos implica el uso, aunque no es estrictamente necesario usarlo, de un grupo “informador” o “marcador”, que se une a la molécula sonda, o tanto a la sonda como a la diana. La fracción de tal grupo informador puede incluir, por ejemplo, un radioisótopo (isótopo radiactivo), un agente quimioluminiscente o fluorescente, o una enzima unida al oligonucleótido. El marcador se emplea para conseguir que la sonda sea capaz de detectar, especialmente cuando la sonda se hibrida con el ácido nucleico diana.

En la mayoría de los métodos de ensayo en los que se utilizan ácidos nucleicos, se hace uso de un paso de separación física con el fin de separar el híbrido sonda:analito de la porción no unida de la sonda. Estos métodos de ensayo se denominan ensayos “heterogéneos”. En los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, una molécula de analito es la especie de ácido nucleico diana que se desea detectar, cuantificar o identificar. Un “híbrido” es ácido nucleico que presenta, parcialmente o en su totalidad, una doble hélice que consta de dos ácidos nucleicos monocatenarios, por ejemplo, una sonda y un ácido nucleico diana, que presentan una región de complementariedad que provoca la unión intermolecular mediante puentes de hidrógeno bajo las condiciones del ensayo o de amplificación.

Entre los métodos de ensayo en los que se utiliza un paso de separación física se incluyen métodos en los que en el proceso de separación se hace uso de una matriz de fase sólida, por ejemplo, vidrio, minerales o materiales poliméricos. La separación puede consistir en unir preferencialmente el complejo sonda:analito a la matriz de fase sólida, y a la vez, permitir que las moléculas sonda que no hayan quedado asociadas permanezcan en una fase líquida. Esta unión entre el complejo sonda:analito y la matriz de fase sólida puede ser no específica, como es, por ejemplo, el caso de la hidroxiapatita, o específica, por ejemplo, mediante la interacción, específica de secuencia, del ácido nucleico diana con una sonda “de captura” que es inmovilizada directa o indirectamente en el soporte sólido. En cualquiera de estos casos, la cantidad de sonda que permanece unida al soporte de fase sólida después de un paso de lavado es proporcional a la cantidad de analito que hay en la muestra.

Como alternativa, el ensayo puede consistir en unir preferencialmente la sonda no hibridada, dejando que el híbrido permanezca en la fase líquida. En tal caso, la cantidad de sonda que hay en la fase líquida después de un paso de lavado es proporcional a la cantidad de analito que había en la muestra original. Cuando la sonda es un ácido nucleico o un oligonucleótido, el soporte sólido puede incluir, entre otros componentes, un adsorbente tal como la hidroxiapatita, una fracción policatiónica, un material hidrófobo o de “fase inversa”, una matriz de intercambio iónico (por ejemplo, DEAE (dietilaminoetanol)), una matriz de filtración en gel, o una combinación de uno o más de estos materiales de fase sólida. El soporte sólido puede contener uno o más oligonucleótidos, u otra fracción que se una de manera específica, para capturar, directa o indirectamente, a la sonda, la diana, o ambas. En el caso de medios, tales como la filtración en gel, el gel de poli(acrilamida) o el gel de agarosa, la separación no se debe a la unión con el oligonucleótido, sino a la tamización molecular de moléculas de diferente tamaño o forma geométrica. En estos últimos dos casos mencionados, la separación puede impulsarse electroforéticamente aplicando una corriente eléctrica a través del gel, lo que ocasiona una migración diferencial, a través de éste, de ácidos nucleicos de diferente tamaño o forma geométrica, por ejemplo, ácidos nucleicos de doble cadena y de una sola cadena.

Un método de ensayo heterogéneo podría consistir también en unir la sonda a una matriz de fase sólida antes de añadir la muestra que se sospecha contiene el analito de interés. Se podría hacer entrar en contacto la muestra con el marcador en condiciones tales que harían que el ácido nucleico deseado quedase marcado, si es que está presente en la mezcla de la muestra. Se pueden añadir derivados a la matriz de fase sólida, o se puede activar dicha matriz, de manera tal que se forme una unión covalente entre la sonda y la matriz. Como alternativa, puede unirse la sonda a la matriz mediante fuertes interacciones no covalentes, incluidas, entre otras, las siguientes interacciones: iónicas, hidrófobas, de fase inversa, inmunofijación, quelación, y enzima-sustrato. Una vez que la sonda unida a la matriz es expuesta, en condiciones que permiten la formación de un híbrido, al ácido nucleico marcado, se lleva a cabo el paso de separación lavando la matriz de fase sólida para que quede libre de analito marcado no unido. Y al revés: se puede unir el analito a la matriz de fase sólida y hacer que entre en contacto con la sonda marcada, lavando la matriz para eliminar el exceso de sonda libre antes de pasar a detectar el marcador.

Hay otro tipo de sistema de ensayo denominado “ensayo homogéneo”. Por lo general, se pueden realizar ensayos homogéneos en una solución, sin llevar a cabo un paso de separación en fase sólida; en los ensayos homogéneos así realizados se suelen aprovechar las diferencias químicas existentes entre la sonda libre y el complejo analito:sonda. Un ejemplo de sistema de ensayo que puede utilizarse en formato homogéneo o heterogéneo es el ensayo de protección de la hibridación (HPA, por sus siglas en inglés) revelado en Arnold, *et al*, patente estadounidense número 5,238,174, en la que se une una sonda a una fracción quimioluminiscente, se la hace entrar en contacto con un analito, y luego

se la somete a degradación química selectiva o a un cambio detectable de la estabilidad, en condiciones que alteran el reactivo quimioluminiscente unido o fijado a una sonda no hibridada, sin alterar el reactivo quimioluminiscente unido o fijado a un conjugado analito:sonda. El subsiguiente inicio de una reacción quimioluminiscente hace que el marcador asociado al híbrido emita luz.

Los ensayos competitivos, en los que un analito o una sonda marcados compiten, con sus análogos no marcados, por unirse, se usan también comúnmente en el formato heterogéneo. En función de cómo esté diseñado el sistema, se puede correlacionar la cantidad de sonda marcada unida, o de sonda marcada no unida, con la cantidad de analito que hay en la muestra. No obstante, también es posible usar este tipo de ensayo en formato homogéneo, sin realizar paso de separación física, o en un formato que incorpore elementos tanto de un ensayo heterogéneo como de un ensayo homogéneo.

Los métodos de ensayo aquí descritos son meramente ilustrativos, y no debe pensarse que representan la totalidad de los formatos de ensayo en los que se utilizan ácidos nucleicos y que son conocidos para aquellos cualificados en la materia.

Se ha utilizado la hibridación de ácidos nucleicos en métodos cuyo fin era usar oligonucleótidos como agentes terapéuticos para modificar o inhibir la expresión de genes dentro de organismos vivos. En un ejemplo de tal utilización, pueden dirigirse agentes "antisense", compuestos de oligonucleótidos, contra una especie de ARNm que codifica un producto genético deletéreo, por ejemplo, una proteína vírica o un oncogén. Véase, por ejemplo, Zamecnik and Stephenson, 75 Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), 280-284 (1978); Stephenson and Zamecnik, 75 Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), 285-288 (1978); y Tullis, Patente estadounidense número 5,023,243. Aunque el Solicitante no desea limitarse a la teoría, se cree que el dúplex ARN:ADN que es originado por la unión del oligonucleótido antisense a las dianas de ARN puede actuar como sustrato de la ARNasa H, que es una enzima que degrada el ARN y que está presente en la mayoría de las células, y que es específica del ARN contenido en el dúplex ARN:ADN. Con arreglo a este modelo, la molécula de ARN diana es destruida por la hibridación con el oligonucleótido antisense. Existen variaciones de esta estrategia general, en las que, por ejemplo, el oligonucleótido tiene una estructura que confiere actividad enzimática sobre el oligonucleótido, como la actividad ARNasa de las llamadas ribozimas. Véase, por ejemplo, Goodchild, Número de publicación PCT WO93/15194.

Dado que los oligonucleótidos antisense terapéuticos están diseñados para funcionar sobre todo *in vivo*, las formulaciones para la administración de tales agentes no deben inhibir significativamente la función celular normal. Así, los inhibidores de la nucleasa, que a veces pueden ser incluidos en pruebas diagnósticas *in vitro* con el fin de evitar la degradación de los oligonucleótidos, no resultan adecuados para su uso *in vivo*. Este hecho ha fomentado el desarrollo de diversos oligonucleótidos modificados a nivel de los enlaces entre nucleótidos, a nivel de la fracción de base o de azúcar, o en forma de combinaciones de estos lugares, con el fin de obtener una mayor resistencia a la nucleasa que la que tiene el ADN no modificado.

Así, se ha creado una serie de derivados de los oligonucleótidos, en los que se han realizado modificaciones en la base nitrogenada, incluida la sustitución, por hidrógeno, del grupo amino presente en la posición 6 de adenosina, con lo que se obtiene una purina; o la sustitución, por hidrógeno, del oxígeno 6-ceto de la guanosina, con lo que se obtiene una 2-amino purina; o la sustitución de este oxígeno 6-ceto de la guanosina por azufre, con lo que se obtiene 6-tioguanosina; así como la sustitución del oxígeno 4-ceto de la timidina por azufre o por hidrógeno, con lo que se obtiene, respectivamente, 4-tiotimidina o 4-hidrotimidina. Todos estos análogos de los nucleótidos pueden ser utilizados como reactantes para la síntesis de oligonucleótidos. Véase, por ejemplo, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, mencionado anteriormente. En la disciplina se conocen otras bases sustituidas. Véase, por ejemplo, Cook *et al.*, Número de publicación PCT WO92/02258, titulada *Nuclease Resistant, Pyrimidine Modified Oligonucleotides that Detect and Modulate Gene Expression*. En el mercado pueden obtenerse derivados de nucleótidos, modificados en cuanto a sus bases nitrogenadas, que pueden utilizarse para la síntesis de oligonucleótidos.

Igualmente, se ha informado de una serie de derivados de nucleótidos con modificaciones en la fracción ribofuranosilo o desoxirribofuranosilo. Véase, por ejemplo, Cook *et al.*, Número de publicación PCT WO94/19023, titulada *Cyclobutyl Antisense Oligonucleotides, Methods of Making and Use Thereof*; McGee *et al.*, Número de publicación PCT WO94/02051, titulada *Novel 2'-O-Alkyl Nucleosides and Phosphoramidites Processes for the Preparation and Use Thereof*; y Cook, Número de publicación PCT W093/13121, titulada *Gapped, 2'-modified Oligonucleotides*.

La mayoría de los oligonucleótidos compuestos de tales bases modificadas han sido formuladas con el objetivo de obtener mayor recaptación celular, mayor resistencia a la nucleasa, o mayor unión al sustrato. En otras palabras, tales oligonucleótidos se describen como agentes terapéuticos moduladores de los genes.

En la naturaleza existen ácidos nucleicos que presentan residuos nucleotídicos modificados. Así, en función de su tipo o de su origen, las bases modificadas del ARN pueden ser, entre otras, bases metiladas o dimetiladas, bases desaminadas, bases carboxiladas, bases azufradas, o bases que presentan varias combinaciones de estas modificaciones. Además, se sabe que en la naturaleza existen ácidos nucleicos que presentan bases 2'-O-alkiladas. Véase Adams, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 7, 8 (onceava edición, 1993).

En la patente europea EP0742287A2 (McGall *et al*) se describe un abanico de posibles modificaciones a las sondas de oligonucleótidos unidas a sustratos sólidos. Se eligen modificaciones diferentes para crear estructuras secundarias en las sondas o para variar la afinidad de las sondas por sus dianas.

5 Resumen de la invención

La presente invención permite usar un oligonucleótido con una modificación 2'-O-metilo, y con una secuencia de nucleótidos conocida, como sonda para una secuencia diana plegada de ARNr, de ARNt, de o ARN vírico, presentes en una muestra que contiene ácido nucleico no diana. Se modifican más de 4 nucleótidos contiguos del oligonucleótido modificado, para incluir una sustitución 2'-O-metilo, y la velocidad de hibridación entre el oligonucleótido modificado y la diana es superior que la velocidad de hibridación que se da entre el oligonucleótido no modificado y la diana.

Básicamente, es posible modificar todos los nucleótidos del oligonucleótido.

Junto con el oligonucleótido modificado, puede usarse una sonda "helper" no marcada.

Se modifica preferiblemente una fracción ribofuranosilo del oligonucleótido.

Se puede unir el oligonucleótido a una molécula de conjugado, que funciona aumentando la afinidad de dicho oligonucleótido por la diana, así como la velocidad de hibridación de dicho oligonucleótido con la diana; la molécula de conjugado se selecciona de un grupo que consta de aminas catiónicas, tintes de intercalación, antibióticos, proteínas, fragmentos peptídicos y complejos metal ión.

El oligonucleótido tiene una longitud, preferiblemente, de entre 10 y 100 bases; idóneamente, de entre 10 y 15 bases. Además, puede incluir un marcador; dicho marcador es, preferiblemente, un agente quimioluminiscente o un agente fluorescente.

Puede haberse sometido la muestra a un procedimiento de amplificación.

El oligonucleótido puede ser inmovilizado uniéndolo directa o indirectamente a un soporte sólido.

La muestra puede obtenerse de una muestra clínica, de un alimento, o de una muestra medioambiental.

La sonda y el complejo sonda:diana pueden estar libres dentro de una solución.

Pueden modificarse por completo los oligonucleótidos usados en la presente invención.

Aunque el término T_m se refiere a la temperatura a la que el 50% de una población de cantidades iguales de cadenas de ácidos nucleicos complementarias están en la forma de doble cadena, en el ámbito de la presente invención, la " T_m de un oligonucleótido o de un ácido nucleico (monocatenario)" significa la T_m de un oligonucleótido o de un ácido nucleico integrado en un dúplex de ácidos nucleicos con una diana, donde el ácido nucleico contiene una región de secuencia de bases que es exactamente complementaria de una región de secuencia de bases del oligonucleótido, a menos que se indique otra cosa.

Como la T_m de los oligonucleótidos modificados es mayor que la de los oligonucleótidos correspondientes, no modificados, que tienen la misma secuencia de bases, el uso de la presente invención significa que en las composiciones y en los métodos de diagnóstico aquí descritos se pueden emplear oligonucleótidos y sondas de oligonucleótidos de longitud inferior a la que de otro modo resulta práctica para la hibridación y detección específicas de las dianas de la invención. El uso de oligonucleótidos más cortos para unirlos de manera específica a ácidos nucleicos diana a una temperatura determinada proporciona ventajas adicionales. Por ejemplo, los oligonucleótidos más cortos tienen, por lo general, una capacidad mayor para discriminar entre dianas perfectamente complementarias y regiones con secuencias de bases "mal emparejadas". Además, es menos probable que estos oligonucleótidos, más cortos, se solapen con secuencias de bases no deseadas. Asimismo, debido a su mayor T_m , los oligonucleótidos modificados pueden hibridarse a temperaturas más altas que los oligonucleótidos no modificados.

El uso de temperaturas de hibridación más altas impulsa cinéticamente la reacción de hibridación, lo que genera velocidades de hibridación superiores a las que se dan a temperaturas más bajas. Además, los oligonucleótidos modificados que se usan en los métodos descritos en la presente invención generan velocidades de hibridación mayores que las de sus análogos no modificados, incluso si no se aumenta la temperatura.

Una velocidad de hibridación más alta proporciona varias otras ventajas en los ensayos diagnósticos. Por ejemplo, los ensayos diagnósticos que se lleven a cabo conforme al uso de la presente invención se puede realizar más rápidamente que los ensayos de hibridación que existían hasta ahora. En los casos en los que los resultados de un ensayo puedan dictaminar cómo se tiene que llevar a cabo un tratamiento médico u otras acciones, el hecho de obtener el resultado del ensayo con mayor rapidez ofrece claras ventajas en cuanto al pronóstico de una enfermedad dada, y puede conducir a un tratamiento más eficaz. Además, gracias a las mayores velocidades de hibridación y a la mayor afinidad que los oligonucleótidos modificados tienen por las dianas, se pueden usar concentraciones inferiores de la sonda de la presente invención para lograr la misma cantidad de señal. De esta manera, puede reducirse la interferencia de fon-

do (“background” o “ruido”) del ensayo, y la menor concentración de sonda puede contribuir a eliminar reacciones cruzadas no deseadas con ácidos nucleicos no diana. Asimismo, se pueden llevar a cabo estos ensayos con mayores volúmenes de muestra, lo que incrementa la sensibilidad del ensayo.

- 5 Y así, con arreglo al uso de la presente invención, pueden diseñarse sondas, para ensayos de hibridación, que aprovechen la mayor velocidad de hibridación específica con las dianas.

Breve descripción de las ilustraciones

- 10 La Figura 1 proporciona la nomenclatura de la IUPAC para un muestrario de ésteres de acridinio que se pueden usar como marcadores quimioluminiscentes detectables en la presente invención.

- La Figura 2 muestra una disposición en la que, para la detección de un analito, antes es necesario que el analito se hibride con un ácido nucleico que no sea la sonda. Conforme a esta disposición, la sonda no es capaz de unirse al analito ni al ácido nucleico que no forma parte de la sonda hasta que el analito se ha hibridado con el ácido nucleico que no forma parte de la sonda. (Las regiones que se han representado con trazos más gruesos representan las regiones de complementariedad entre el analito y el ácido nucleico que no forma parte de la sonda.) Sin embargo, la hibridación del analito con el ácido nucleico que no forma parte de la sonda altera la configuración de este último, en un grado que es suficiente para posibilitar la hibridación de la sonda con el ácido nucleico que no forma parte de la sonda, lo que permite detectar el analito.

- La Figura 3 muestra la curva de fusión de una sonda de 2'-O-metil-oligonucleótidos con una diana de ARN o con una diana de ADN (dos experimentos diferentes), donde la fusión se representa como un aumento de la absorbancia lumínica a 260 nm (desplazamiento hipercromático).

- La Figura 4 muestra la hibridación de una concentración única de desoxi- o 2'-O-metil-oligonucleótidos, de secuencias de bases idénticas, marcados con éster de acridinio, con cantidades variables de una diana de ARN plenamente complementaria, durante un período de hibridación fijo.

- La Figura 5 muestra la hibridación de cantidades variables de desoxi- o 2'-O-metil-oligonucleótidos, de secuencias de bases idénticas, marcados con éster de acridinio, con cantidades fijas de una diana de ARN plenamente complementaria, durante un período de hibridación fijo.

- La Figura 6 muestra la hibridación de una cantidad fija de desoxi- y 2'-O-metil-oligonucleótidos, de secuencias de bases idénticas, marcados con éster de acridinio, con una cantidad fija de una diana de ARN plenamente complementaria, durante períodos de hibridación diversos.

- La Figura 7 muestra la hibridación de una sonda de ADN o de una sonda de 2'-O-metil-oligonucleótidos, con una diana de ARN plenamente complementaria. Los datos se han representado con arreglo a la ecuación: $\ln(1-H) = (k) (C_0 t)$, en la que H es el porcentaje de hibridación, k es la constante de la velocidad de hibridación, C_0 es la concentración de la sonda, y t es el tiempo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se indique claramente de otro modo, en el ámbito de esta invención, los términos siguientes tienen los significados indicados.

- 50 Por “analito de ácido nucleico” o por “analito” se entiende un ácido nucleico que se desea detectar en una muestra o un ácido nucleico sintetizado gracias a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y que contiene al menos unos 20 nucleótidos de la secuencia de bases nucleotídicas de un ácido nucleico que se quiere detectar en una muestra, o del complemento de aquélla.

- 55 Por “sintetizar” un ácido nucleico o un oligonucleótido se entiende crear el ácido nucleico mediante síntesis química o por medios enzimáticos. Se sabe que ciertas polimerasas con actividad enzimática sobre los ácidos nucleicos son capaces de incorporar, durante la síntesis enzimática, nucleótidos modificados.

- 60 Por “modificado”, “nucleótido modificado” o “modificación” se entiende una variante intencionada de los clásicos ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos A, T, G, C y U. En esta invención, el término “modificado” se refiere a una variante de los nucleótidos clásicos, y dichas variantes proporcionan una mayor eficiencia de unión cuando un oligonucleótido que contiene dichos nucleótidos modificados se hibrida con un ácido nucleico diana, que cuando ese mismo oligonucleótido contiene los nucleótidos clásicos. En algunos casos se hace mención de un oligonucleótido que tiene un extremo 3' modificado. Eso significa que el extremo 3' del oligonucleótido presenta una sustitución que inhibe o impide la extensión (el alargamiento) del extremo 3' por parte de una polimerasa de ácidos nucleicos.

Por “molécula de conjugado” se entiende una molécula que puede unirse con un oligonucleótido de una manera tal que, en el producto combinado resultante, se retienen por lo menos algunas de las características tanto de la molécula

como del oligonucleótido. La mayoría de las veces, la molécula de conjugado aporta una propiedad física o química nueva al oligonucleótido, mientras que el oligonucleótido mantiene su capacidad para emparejarse por pares de bases.

Por “afinidad de unión” se entiende una medida de la intensidad de la unión, mediante puentes de hidrógeno, entre ácidos nucleicos que son al menos parcialmente complementarios, en condiciones de hibridación de ácidos nucleicos bien definidas. Una manera práctica de medir la eficiencia de unión es la T_m , que es la temperatura a la que el 50% de las anteriormente mencionadas dos hélices están en la forma de doble cadena o hibridada.

Por “marcador” se entiende una fracción “informadora” que es capaz de ser detectada como indicación de la presencia del oligonucleótido al que se une. Cuando el oligonucleótido marcado se hibrida con uno o más oligonucleótidos, la presencia del marcador puede ser una indicación de la presencia de otro oligonucleótido u oligonucleótidos. En la disciplina se conocen fracciones informadoras adecuadas, que pueden ser, entre otras, radioisótopos, tintes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fluorescentes, compuestos que son a la vez quimioluminiscentes y electroluminiscentes, secuencias de ácidos nucleicos, enzimas, sustratos de enzimas, cromóforos y haptenos.

Por “condiciones del ensayo con ácidos nucleicos” se entiende las condiciones ambientales, incluidas la temperatura y la concentración de sales, que favorecen la formación de híbridos estables entre regiones con secuencias de bases complementarias, en vez de favorecer la formación de híbridos estables entre regiones con secuencias de bases no complementarias.

Por “derivado de éster de acridinio” o “EA” se entiende cualquiera de una familia de compuestos derivados del anillo del acridinio que tienen un éster marcado o una unión de tipo éster marcada en la posición C9, que conecta el anillo del acridinio a un grupo saliente. El grupo saliente es, preferiblemente, un grupo arilo o arilo sustituido. Se pueden realizar sustituciones, tales como un grupo alquilo (*por ejemplo*, metilo), un grupo alcoxi (*por ejemplo*, metoxi), un grupo arilo y haluro (*por ejemplo*, Br y F), en el anillo del acridinio, en el grupo saliente, o en ambos. En la Figura 1 se muestran ejemplos de estos ésteres de acridinio.

En la presente invención se describe el descubrimiento inesperado, por parte del inventor, de que los oligonucleótidos que contienen uno o más nucleótidos modificados de tal manera que dichos oligonucleótidos tienen una mayor T_m en relación con una diana dada (en comparación con los mismos oligonucleótidos, pero no modificados), se hibridan con una diana dada a una velocidad mayor que la de los oligonucleótidos no modificados. Se produce un aumento máximo de la velocidad de hibridación de un oligonucleótido modificado cuando se modifica un “racimo” (“clúster”) de nucleótidos. Por “racimo” se entiende que se modifica, de la manera expuesta anteriormente, un mínimo de unos 4 de 5 nucleótidos consecutivos. De este modo, los oligonucleótidos que contienen una mezcla de nucleótidos modificados y no modificados pueden ser igual de eficaces, para aumentar la velocidad de hibridación con la diana, que los oligonucleótidos que contienen un 100% de nucleótidos modificados. Algunos aspectos de la presente invención se refieren la creación de oligonucleótidos “quiméricos” que contienen oligonucleótidos tanto modificados como no modificados.

Cuando se usa en este contexto, un ácido nucleico “diana” es un ácido nucleico que se desea hibridar con un oligonucleótido. Dicho ácido nucleico puede ser un ácido nucleico que se dé en la naturaleza (*por ejemplo*, ARN ribosómico), puede ser el producto (*por ejemplo*, un “amplicón”) del uso de métodos de amplificación de los ácidos nucleicos, tales como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o de un método de amplificación basado en la transcripción, como se describe más detalladamente más adelante, o puede ser otro oligonucleótido sintético.

En la presente invención se describen métodos de diagnóstico y composiciones en los que se hace uso de oligonucleótidos modificados que producen un aumento de la velocidad de hibridación oligonucleótido:diana, en comparación con la velocidad de hibridación entre la diana y un oligonucleótido no modificado que tenga la misma secuencia de bases.

Las modificaciones a la posición 2' del anillo del desoxirribofuranosilo (o ribofuranosilo) consisten en colocar un grupo que no sea ni hidrógeno ni hidroxilo en la posición 2' del anillo del ribofuranosilo. Sea cual sea la naturaleza de la sustitución, no debe dificultar estéricamente la capacidad, de un oligonucleótido que contenga una o más de tales modificaciones en sus nucleótidos, para hibridarse con un oligonucleótido monocatenario que presente una secuencia de bases nucleotídicas complementaria. La hibridación de ácidos nucleicos de doble cadena complementarios en los que una cadena contenga tales modificaciones es sensiblemente mayor que en las situaciones en las que ninguna de ambas cadenas está modificada de la manera expuesta.

Cuando se dice que un oligonucleótido modificado tiene una afinidad o velocidad “aumentada” o “mayor”, significa que la velocidad de hibridación o la afinidad de ese oligonucleótido modificado es mayor que la velocidad de hibridación con la misma diana o la afinidad por la misma diana de un oligonucleótido no modificado que tenga la misma longitud y la misma secuencia de bases.

Los oligonucleótidos sustituidos con un grupo metoxi en la posición 2' del azúcar muestran mayor preferencia por dianas de ARN que por dianas de ADN que tengan la misma secuencia que la diana de ARN (salvo que, en el ARN, el U ocupa las posiciones que la T tiene en el ADN), tanto en términos de T_m como en términos de la velocidad de hibridación. En la disciplina se conocen otros oligonucleótidos de estas características.

Las moléculas de conjugado unidas a los oligonucleótidos modificados que aquí se describen pueden funcionar de manera tal que aumentan aún más la afinidad de unión y la velocidad de hibridación de estos oligonucleótidos con una diana. Ejemplos de estas moléculas de conjugado pueden ser, entre otros: aminos catiónicas, tintes de intercalación, antibióticos, proteínas, fragmentos peptídicos, y complejos metal ión. Entre las aminos catiónicas están, por ejemplo, la espermina y la espermidina, es decir, poliaminas. Entre los tintes de intercalación conocidos en la disciplina están, por ejemplo, el bromuro de etidio, las acridinas y la proflavina. Entre los antibióticos que se pueden unir a los ácidos nucleicos están, por ejemplo, la actinomicina y la netropsina. Entre las proteínas capaces de unirse a los ácidos nucleicos están, por ejemplo, las enzimas de restricción, los factores de transcripción, y las enzimas modificadoras del ADN y del ARN. Los fragmentos peptídicos capaces de unirse a los ácidos nucleicos pueden contener, por ejemplo, un motivo SPKK (serina-prolina-lisina (arginina)-lisina (arginina)), un motivo KH o un motivo de caja RGG (arginina-glicina-glicina). Véase, por ejemplo, Suzuki, *EMBOJ*, 8:797-804 (1989); y Bund *et al*, *Science*, 265:615-621 (1994). Entre los complejos metal ión que se pueden unir a los ácidos nucleicos están, por ejemplo, el complejo hexamina-cobalto y el complejo 1,10-fenantrolina-cobre. Los oligonucleótidos representan otro tipo más de moléculas de conjugado cuando, por ejemplo, el híbrido resultante incluye tres o más ácidos nucleicos. Un ejemplo de un híbrido de esas características podría ser un triplex compuesto de un ácido nucleico diana, una sonda de oligonucleótidos hibridada con la diana, y una molécula de conjugado de oligonucleótidos hibridada con la diana. Las moléculas de conjugado pueden unirse a los oligonucleótidos de diversas maneras, entre otras: mediante intercalación, interacción con el surco, unión electrostática, y puentes de hidrógeno. Aquellos cualificados en la materia estarán complacidos por el hecho de que se pueden fijar otras moléculas de conjugado a los oligonucleótidos modificados que son objeto de la presente invención. Véase, por ejemplo, Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, 1 (3):165-187 (1990). Además, se puede fijar o unir una molécula de conjugado a un nucleótido o a nucleótidos antes o después de la síntesis del oligonucleótido que contiene el nucleótido o los nucleótidos.

El Solicitante ha descubierto también, de forma inesperada, que el aumento que se observa en la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados con sus dianas no siempre continúa de manera indefinida a medida que va aumentando el número de oligonucleótidos modificados contiguos, especialmente cuando la diana tiene una estructura abierta o no plegada, o cuando hay sondas “helper” presentes. En tales circunstancias, la colocación de los oligonucleótidos modificados en una disposición esencialmente contigua, es decir, unos 4 ó 5 nucleótidos contiguos en el oligonucleótido, seguida por la hibridación con una diana complementaria, generará un aumento en la velocidad de hibridación, pero sólo hasta alcanzado un número determinado de modificaciones. Por lo general, la adición de nucleótidos modificados al racimo, más allá de este número determinado, no generará un aumento sustancial de la velocidad de hibridación.

En los oligonucleótidos modificados en los que se emplean sustituciones 2'-O-metilo, se obtienen velocidades de hibridación óptimas en los oligonucleótidos que presentan un racimo de unos 8 residuos modificados contiguos. Dado el descubrimiento de que los oligonucleótidos modificados pueden aumentar la velocidad de hibridación, no se esperaba que este efecto no acompañe siempre al aumento de la T_m causado por la adición de oligonucleótidos modificados. Es decir, la adición de oligonucleótidos modificados más allá del tamaño óptimo del racimo para la velocidad de hibridación sigue incrementando la T_m .

Aunque el Solicitante no desea verse limitado por la teoría, se cree que tales racimos actúan como “centros de nucleación”, que son las primeras regiones del oligonucleótido o del ácido nucleico que se unen mediante puentes de hidrógeno, en un paso que limita la velocidad, seguido por la rápida unión, mediante puentes de hidrógeno, del resto de las bases. Aunque es posible modificar, de la manera expuesta, la totalidad del oligonucleótido o del ácido nucleico, parece que se obtiene un escaso aumento de la velocidad de hibridación una vez que se supera sustancialmente el tamaño óptimo del racimo.

Sin embargo, cuando la estructura de la diana es de tipo cerrado o plegado y no se incluyen sondas “helper”, en general es posible aumentar la velocidad de hibridación entre el oligonucleótido y la diana añadiendo nucleótidos modificados al oligonucleótido en un número superior a unos 4 nucleótidos modificados contiguos. En una forma de realización preferida, se modifican virtualmente todos los nucleótidos de un oligonucleótido complementario a la estructura de la diana que presenta una estructura de tipo cerrado.

La velocidad de hibridación, en una solución, de dos ácidos nucleicos monocatenarios complementarios, depende de diversos factores, tales como la concentración de los ácidos nucleicos, la temperatura de hibridación, y las propiedades de la solución de solvente, por ejemplo, la concentración de sales. Se han empleado diversas metodologías para aumentar las velocidades de hibridación. La mayoría de dichas metodologías implican cambiar el sistema de solvente, por ejemplo: formar emulsiones de solventes inmiscibles; emplear agentes que precipitan los ácidos nucleicos (por ejemplo, Kohne *et al*, patente estadounidense número 5,132,207), o agentes incrementadores del volumen, por ejemplo, polietilenglicol; o aumentar la concentración de la cadena de un ácido nucleico.

Un problema asociado al uso de este último enfoque en un ensayo diagnóstico es que habitualmente el ácido nucleico diana está presente en cantidades bastante pequeñas. Por eso, para aumentar la concentración de un ácido nucleico es necesario usar un exceso de oligonucleótido, lo que genera un aumento del coste y de los residuos de reactivos, y además, si se marca el oligonucleótido, existe el riesgo de obtener “ruidos” inaceptablemente altos. Los demás métodos, como los que hacen necesario el uso de varios solventes y reactivos, por ejemplo, polietilenglicol, pueden conllevar dificultades de orden práctico, como una manipulación de muestras y un tiempo excesivos.

En la presente invención se describen maneras de aumentar las velocidades de hibridación de los oligonucleótidos con las dianas de ARN, así como para aumentar la afinidad de unión de los oligonucleótidos por las dianas de ARN, usando oligonucleótidos que contienen nucleótidos con una sustitución en la posición 2' del anillo del ribofuranosilo ("oligonucleótido modificado en 2-"), incluida una sustitución alcoxi y una sustitución metoxi. Estas propiedades proporcionan métodos útiles para el uso de tales oligonucleótidos en un formato de ensayo de hibridación diagnóstico mediante el aumento de la velocidad y la extensión de la hibridación de un oligonucleótido de las mencionadas características, sin que se necesite un aumento concomitante de las concentraciones de los ácidos nucleicos que se hibridan, un cambio en las propiedades o en la composición de la solución de hibridación, la adición de "oligonucleótidos helper" (descrita en Hogan & Milliman, patente estadounidense número 5,030,557), ni un aumento de la temperatura de hibridación. No obstante, el uso de la presente invención puede complementar el uso de una o más de las técnicas citadas en cualquier procedimiento en el que un aumento de la velocidad de hibridación de los ácidos nucleicos resulte ventajosa.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las ventajas descritas en la presente invención se refiere a la capacidad de los oligonucleótidos con modificaciones 2'-O-metilo para hibridarse preferencialmente con el ARN, más que con el ADN. Esta propiedad permite diseñar sondas de oligonucleótidos dirigidas contra el ARN. Pueden crearse sondas que no tienden a unirse al ADN en condiciones de hibridación astringentes, incluso si la secuencia del ADN es idéntica a la secuencia del ARN diana (idéntica salvo por el hecho de que, en el ARN, el U ocupa las posiciones que la T tiene en el ADN). Tales propiedades pueden utilizarse en una serie de formatos diferentes en los que la detección específica del ARN sea una ventaja. Por ejemplo, para indicar y medir cambios en la velocidad de transcripción de especies de ARN concretas, tales como, por ejemplo, especies de ARNm concretas; para realizar un seguimiento de la eficacia de una terapia determinada; para sondear, de manera específica, ARNt o ARNr, con preferencia por los genes que codifican estas especies de ARN; y para detectar, de manera específica, virus ARN en preparaciones de ácidos nucleicos que contengan grandes cantidades de ADN cromosómico, incluso en preparaciones de ADN que contengan "versiones ADN" de las secuencias virales.

Una ventaja adicional de este y de otros aspectos es una T_m diana:oligonucleótido aumentada cuando se usan oligonucleótidos modificados, por ejemplo oligonucleótidos con modificaciones 2', en comparación con la T_m de los híbridos diana:oligonucleótido cuando el oligonucleótido es un desoxioligonucleótido. Por "diana:oligonucleótido" se entiende un complejo de ácidos nucleicos de doble cadena, unidos por puentes de hidrógeno, que contiene un oligonucleótido monocatenario. La estabilidad del complejo diana:sonda aumenta cuando aumenta el número de residuos de nucleótidos con modificaciones 2' que contiene la sonda. En cambio, el aumento de la velocidad de hibridación parece ser óptimo en los ácidos nucleicos que tienen un racimo de unos 8 residuos nucleotídicos con modificaciones 2' y no aumenta significativamente cuando se añaden residuos nucleotídicos modificados consecutivos por encima de esa cifra. Asimismo, se podrían diseñar oligonucleótidos "quiméricos" que tengan por lo menos un racimo de nucleótidos modificados, para obtener velocidades de hibridación mayores sin que necesariamente se incremente significativamente la T_m del oligonucleótido entero en relación con su diana.

Una T_m más alta puede ser aprovechada en cualquier procedimiento de diagnóstico en el que sea deseable contar con la estabilidad añadida de un dúplex de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden usar temperaturas de hibridación más altas para acelerar la velocidad de hibridación. Además, una T_m más alta permite usar oligonucleótidos sustancialmente más cortos que los que resultaba práctico usar hasta ahora; de esta manera, se obtiene un ahorro en los costes asociados con la producción de oligonucleótidos para la hibridación, así como otras ventajas, como se ha expuesto anteriormente.

Los oligonucleótidos quiméricos pueden contener una porción modificada diseñada para unirse al ácido nucleico diana, y pueden contener también una porción desoxinucleotídica que sea capaz de unirse, directa o indirectamente, a un oligonucleótido fijado a una fase sólida. Como ejemplo, entre otros muchos, tal oligonucleótido puede ser un oligonucleótido de captura de diana diseñado para unirse a un ácido nucleico diana (por ejemplo, en una solución) y enlazar el ácido nucleico diana "capturado" a una matriz en fase sólida, que tenga derivados unidos; tal matriz puede ser, por ejemplo, una perla, una microesfera, una sustancia polimérica (tal como la agarosa o el dextrano), o una partícula magnetizada. Los derivados unidos a la matriz puede ser, entre otros, antibióticos, ligandos, u oligonucleótidos total o parcialmente monocatenarios que presenten una secuencia de nucleótidos específica, como por ejemplo, un tracto homopolimérico, diseñada para fijar el oligonucleótido que se desea capturar o un oligonucleótido intermedio. Después, la diana fijada se puede hibridar aún más con una sonda (de ARN, de ADN, o modificada), y se pasaría a lavar la sonda no unida para que quede libre del complejo sonda:diana inmovilizado, antes de realizar la detección de la presencia del ácido nucleico diana.

En determinadas circunstancias puede ser beneficioso aumentar la temperatura con la que hibridar un oligonucleótido modificado con su diana. Como se ha descrito anteriormente, aumentar la temperatura de hibridación incrementa también la velocidad de hibridación, siempre que la temperatura de hibridación esté suficientemente por debajo de la T_m del híbrido deseado. Los métodos de hibridación reivindicados en la presente invención, en los que se emplean oligonucleótidos modificados que tienen una T_m más alta que la de sus análogos no modificados, pueden llevarse a cabo a temperaturas superiores a las que de otro modo se podrían usar. En tal caso, el aumento de la velocidad de hibridación que se debe exclusivamente a la modificación, es aumentado aún más por la temperatura superior que se utiliza.

A continuación se presentan ejemplos que incluyen formas de realización de la invención; no debe pensarse que tales ejemplos constituyen el único ámbito de dicha invención. Aquellos cualificados en la materia concebirán fácilmente formas de realización adicionales basándose en la información contenida en este documento.

5 Sondas de ácidos nucleicos modificados para ensayos de hibridación

Los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos hacen uso de una o más sondas de ácidos nucleicos dirigidas contra un ácido nucleico que se desea detectar; “dirigidas contra” significa que tienen una secuencia de bases nucleotídicas que es esencialmente complementaria de la del ácido nucleico que se desea detectar. A menudo la sonda consta de un oligonucleótido (un ácido nucleico monocatenario que tiene de unos 10 a unos 100 nucleótidos de longitud) que se crea sintéticamente para que tenga una secuencia de nucleótidos determinada. Por “esencialmente complementaria” se entiende que el oligonucleótido se une con su diana en las condiciones selectivas adecuadas, formando un dúplex unido por puentes de hidrógeno.

Aunque, por lo general, una sonda de un ensayo de hibridación se fija a un marcador detectable, puede no marcarse la sonda y, en vez de eso, detectar el híbrido sonda:diana mediante, por ejemplo, absorbancia de luz ultravioleta, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel y posterior tinción del híbrido de ácidos nucleicos, o mediante otros métodos bien conocidos en la disciplina. En los ensayos de hibridación, se hace entrar en contacto la sonda y la diana en condiciones que permiten una hibridación estable y específica. Después, el híbrido resultante se separa del híbrido no marcado y se detecta el marcador, o bien puede detectarse el marcador en condiciones que permiten detectar preferentemente el híbrido, en vez de detectar el híbrido no marcado.

En la disciplina se conocen métodos para separar ácidos nucleicos; por ejemplo: cromatografía de exclusión (filtración en gel), cromatografía en fase inversa, y adsorción con hidroxapatita. El Solicitante prefiere usar un formato de ensayo en el que el híbrido marcado y la sonda no marcada sin hibridar puedan diferenciarse químicamente mediante la formación de una doble hélice. Un formato de ensayo particularmente preferido es el ensayo de protección de la hibridación, véase la patente estadounidense número 5,283,174 de Arnold *et al*, en el que es posible hacer, de forma selectiva, que la sonda no marcada sin hibridar sea indetectable, mientras que la sonda hibridada queda relativamente no afectada. De este modo, la detección del marcador, en este formato de ensayo, es una indicación del híbrido marcado.

En la presente invención se describe el uso, como sondas, de oligonucleótidos modificados en un ensayo de hibridación. Los oligonucleótidos modificados que tienen una T_m específica de diana más alta que los oligonucleótidos no modificados de idéntica secuencia de bases pueden emplearse para aumentar la velocidad de hibridación del ensayo, en comparación con los ensayos en los que se usen oligonucleótidos no modificados con la misma secuencia de bases. En el tipo de métodos de ensayo objeto de la presente invención es posible utilizar temperaturas de hibridación más altas que las que es posible emplear usando oligonucleótidos no modificados. Esta temperatura de hibridación más alta aumenta aún más la velocidad de hibridación, y asimismo, puede reducir la cantidad de hibridación cruzada (hibridación de la sonda con secuencias no diana), lo que incrementa la especificidad del ensayo.

Las sondas descritas en la presente invención pueden constar de un racimo de unos 4 o más residuos nucleotídicos modificados esencialmente contiguos, mezclados con residuos no modificados.

Como alternativa, la sonda puede constar de un 100% de residuos modificados.

La modificación de una sonda de oligonucleótidos de tal manera que incluya sustituciones 2'-O-metilo hace que dicha sonda de oligonucleótidos presente una mayor afinidad por las dianas de ARN, así como una mayor velocidad de hibridación con dichas dianas de ARN, sin que se produzca apenas efecto sobre su afinidad por el ADN ni sobre la velocidad de formación de híbridos sonda:ADN. De nuevo, se ha hallado que esta preferencia por el ARN se optimiza cuando el oligonucleótido tiene al menos un racimo de unas 4 a unas 8 bases modificadas.

Puesto que los oligonucleótidos modificados de la manera aquí expuesta presentan una velocidad de hibridación muchísimo más alta, en muchos casos es posible usar tales sondas de oligonucleótidos modificados sin necesidad de añadir “sondas helper” no marcadas, que se describen en Hogan (*citado anteriormente*), como forma de aumentar las velocidades de hibridación de la sonda con la diana. No obstante, el Solicitante ha descubierto que en algunos casos el uso combinado de tales oligonucleótidos modificados y sondas “helper” puede generar un funcionamiento combinado que aumenta aún más la velocidad de hibridación. En cualquier caso, el uso de dichos oligonucleótidos modificados en los métodos de diagnóstico permite identificar más rápidamente los analitos de origen biológico, lo que a su vez conduce, por ejemplo, a tratamientos más eficaces para las enfermedades provocadas o indicadas por dichos analitos.

Como se describe más detalladamente más adelante, el Solicitante ha descubierto que es posible usar las sondas que muestran una afinidad preferencial por las dianas de ARN para detectar de manera específica el ARN, frente a ADN de idéntica secuencia (idéntica salvo por el hecho de que, en el ARN, el U ocupa las posiciones que la T tiene en el ADN). Tales métodos tienen aplicación, por ejemplo, en la detección específica de los virus ARN en las células que contienen “versiones ADN” del genoma vírico, o en la detección específica de los niveles de transcripción del ARN en las células.

También pueden diseñarse sondas que contienen tanto secuencias complementarias de la secuencia de la diana como secuencias adicionales, no complementarias de la secuencia de la diana. Estas secuencias no complementarias de la secuencia de la diana pueden desempeñar otras funciones. Por ejemplo, pueden ser complementarias de la secuencia de otro oligonucleótido o de la de un ácido nucleico diana, o pueden presentar propiedades funcionales, por ejemplo, como secuencias promotoras o como sitios de restricción. Así, una sonda puede tener más de una función, y puede que sólo una de sus funciones sea la que se deba detectar como indicación de la presencia de una diana.

Además, pueden diseñarse sondas de modo tal que tengan al menos dos secuencias complementarias de la secuencia de la diana, que puedan hibridarse con un ácido nucleico diana. En Hogan *et al*, patentes estadounidenses números 5,424,413 y 5,451,503, se describe un ejemplo de estas sondas. Las sondas descritas por Hogan *et al* incluyen además un mínimo de dos brazos que no se hibridan con la diana, sino que poseen regiones complementarias que son capaces de hibridarse entre sí. Es posible diseñar estos brazos para que precisen de la presencia de la diana para que sus secuencias complementarias puedan hibridarse en las condiciones de hibridación adecuadas. En tal caso, para que los brazos puedan hibridarse entre sí, antes es necesario que las secuencias complementarias de la secuencia de la diana se hibriden con la diana. La estructura resultante se denomina ácido nucleico ramificado.

Pueden diseñarse otras sondas que no sean capaces de unirse de manera específica a la diana. Para que resulten útiles para detectar la diana, este tipo de sondas deben ser capaces de hibridarse con otro ácido nucleico que sea capaz de unirse a la diana, ya sea directa o indirectamente. Un ejemplo de tal disposición puede consistir en un ácido nucleico que puede ser estructurado para que contenga al menos una primera y una segunda región con una secuencia de bases nucleotídicas que no se superpongan; la primera de tales regiones sería complementaria de una secuencia de bases nucleotídicas de la diana, y la segunda de tales regiones sería complementaria de una secuencia de bases nucleotídicas de la sonda. En esa disposición, la segunda región de nucleótidos del ácido nucleico no estaría disponible para su unión a la sonda hasta que la diana se haya hibridado con la primera región de nucleótidos del ácido nucleico. La unión del ácido nucleico con la diana alteraría la configuración del ácido nucleico, lo que permitiría que la segunda región de nucleótidos del ácido nucleico se uniese con la sonda. Véase la Figura 2. Por supuesto, sería posible modificar esta disposición de manera tal que la unión indirecta entre el ácido nucleico y la diana, lograda gracias a uno o más ácidos nucleicos participantes o “de acoplamiento”, hiciese que la segunda región de nucleótidos del ácido nucleico estuviese disponible para unirse a la sonda.

Oligonucleótidos modificados para la amplificación de ácidos nucleicos

En la presente invención se describen métodos para emplear cebadores (“primers”), cebadores promotores o plantillas de ajuste (“splicing”), basados en oligonucleótidos modificados, para la amplificación de ácidos nucleicos. También se describen composiciones que incluyen tales oligonucleótidos modificados, en las que los oligonucleótidos modificados contienen al menos un racimo de bases modificadas que origina un aumento de la velocidad de hibridación.

Entre los métodos de amplificación en los que se emplean cebadores está el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variaciones, como se describe en Mullis *et al*, (véanse las patentes estadounidenses números 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159, así como las solicitudes de patentes europeas números 86302298.4, 86302299.2 y 87300203.4, y el volumen 155 de la revista *Methods in Enzymology*, 335-350 (1987)). Hoy en día, la metodología PCR es ya una materia bien conocida para aquellos cualificados en la materia.

Se ha acoplado el método PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a la transcripción de ARN, incorporando una secuencia promotora a uno de los cebadores empleados en la reacción PCR y, después, tras la amplificación obtenida mediante PCR, usando el ADN de doble cadena como una plantilla para la transcripción del ARN monocatenario. (Véase, por ejemplo, Murakawa *et al*, *DNA*, 7:287-295 (1988)).

Otros métodos de amplificación hacen uso de varios ciclos de síntesis y transcripción del ADN, dirigidos por el ARN, para amplificar dianas de ADN o de ARN. Véase, por ejemplo, Burg *et al*, patente estadounidense número 5,437,990; 89/1050; Gingeras *et al*, WO 88/10315; Davey and Malek, Número de publicación EPO 329 8223; Malek *et al*, WO91/02818, Kacian and Fultz, patente estadounidense número 5,480,783; McDonough *et al*, WO94/03472; y Kacian *et al*, WO93/22461. En Urdea *et al*, WO91/10746, se describe un método en el que se logra la amplificación de la señal usando una secuencia promotora T7.

Cada uno de estos métodos hace uso de uno o más cebadores o plantillas de ajuste, a base de oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse con una determinada secuencia de nucleótidos deseada, o de hibridarse cerca de ésta. Tras la hibridación del cebador, la cadena de ácido nucleico complementaria de la diana es sintetizada enzimáticamente, ya sea mediante extensión del extremo 3' del cebador o mediante transcripción, usando un cebador promotor o una plantilla de ajuste. En algunos métodos de amplificación, por ejemplo, en el método PCR, se alternan rondas de extensión del cebador (mediante una enzima que polimeriza el ácido nucleico) con la desnaturalización térmica de las cadenas de ácido nucleico complementarias. Otros métodos, tales como los de Kacian & Fultz, citado anteriormente, McDonough *et al*, citado anteriormente, y Kacian *et al*, citado anteriormente, son métodos de amplificación isotérmica basada en la transcripción.

Sin embargo, en cada método de amplificación, las reacciones secundarias causadas por la hibridación del cebador con las secuencias no diana pueden reducir la sensibilidad de la reacción específica de diana. Es posible reducir la

incidencia de estos “emparejamientos incorrectos” competitivos aumentando la temperatura de reacción. No obstante, aumentar la temperatura puede también reducir la cantidad de unión específica del cebador con la diana.

En relación con esto, en la presente invención se describen cebadores que tienen una alta afinidad por la diana y que constan de nucleótidos modificados en la región de unión a la diana. Dichos cebadores pueden usarse en los métodos de amplificación de ácidos nucleicos para amplificar y detectar con mayor sensibilidad cantidades pequeñas de una secuencia de ácido nucleico diana, gracias a la mayor temperatura (y con ésta, gracias a la mayor velocidad de hibridación con las moléculas diana), a la vez que se reduce la incidencia de reacciones secundarias competitivas (re-actividad cruzada) debidas a la unión no específica con la diana. Algunos oligonucleótidos pueden contener al menos un racimo de bases modificadas, pero, en los oligonucleótidos preferidos, no todos los nucleótidos son nucleótidos modificados.

En la presente invención se describen asimismo cebadores con oligonucleótidos modificados que se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en la que el ácido nucleico diana es ARN. Véase, por ejemplo, Kacian and Fultz, *citado anteriormente*. La diana puede ser el ácido nucleico presente inicialmente en la muestra, o puede ser un intermediario de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos. El uso de cebadores modificados en 2', por ejemplo, de oligonucleótidos que contengan nucleótidos con sustituciones 2'-O-metilo, permite trabajar a una mayor temperatura de hibridación, gracias a la T_m relativamente más alta que estos oligonucleótidos modificados le confieren al híbrido, en comparación con la T_m de los desoxioligonucleótidos de idéntica secuencia. Además, gracias a la preferencia de los oligonucleótidos modificados con 2'-O-metilo por el ARN (y no por el ADN), también es posible reducir la competición por las moléculas de cebador por parte de las secuencias de ADN no diana contenidas en una muestra de ensayo. Asimismo, en aplicaciones en las que se desee detectar secuencias específicas de ARN de entre una población de moléculas de ADN que tengan la misma secuencia de ácidos nucleicos (salvo por el hecho de que, en el ARN, el uracilo (U) ocupa las posiciones que la timidina (T) tiene en el ADN), el uso de cebadores con oligonucleótidos modificados que tengan preferencia cinética y de equilibrio por el ARN permite la amplificación específica del ARN (y no del ADN) contenido en una muestra.

Procesado de las muestras

Como se ha descrito anteriormente en este documento, los oligonucleótidos modificados que presentan, de manera específica, una mayor velocidad de hibridación con la diana, así como una mayor afinidad de unión con ésta, en comparación con sus análogos no modificados, se pueden usar en una amplia variedad de metodologías de procesado de muestras en ensayos de hibridación.

Por procesado de muestras se entiende los métodos que permiten o mejoran la discriminación entre ácidos nucleicos analito y no analito. En tales métodos se puede realizar, por ejemplo, una inmovilización directa o indirecta de los ácidos nucleicos u oligonucleótidos de la fase líquida en un ensayo heterogéneo. En algunos de tales métodos pueden tener lugar dos o más eventos de hibridación con los que se logra tal inmovilización.

Por ejemplo, en Ranki *et al*, patentes estadounidenses números 4,486,539 y 4,563,419, se describe un método de hibridación de ácidos nucleicos en “sándwich”, que tiene un único paso, en el que se usa un ácido nucleico, unido a una fase sólida, que tiene una secuencia complementaria de la secuencia de la diana, así como una sonda de ácidos nucleicos marcada que es complementaria de otra porción del ácido nucleico diana. En Stabinsky, patente estadounidense número 4,751,177, se describen métodos en los que se usa un polinucleótido “mediador” que, según se informa, resuelve los problemas de sensibilidad, asociados a la fuga del oligonucleótido inmovilizado del soporte sólido, que se dan en el método de Ranki.

Otros métodos pueden hacer uso de un oligonucleótido inmovilizado, por ejemplo, un oligonucleótido que contenga un tracto homopolimérico, tal como poli-T, o que contenga una secuencia simple corta repetida, así como de dos o más oligonucleótidos de acoplamiento, uno de los cuales es capaz de hibridarse con el oligonucleótido inmovilizado, y otro de los cuales es capaz de hibridarse, de manera específica, con la diana. Cada uno de estos oligonucleótidos de acoplamiento es capaz de unirse al menos con otro oligonucleótido de acoplamiento. Si un oligonucleótido de acoplamiento no contiene una secuencia que sea complementaria de la secuencia de la diana o de la secuencia del oligonucleótido inmovilizado, será capaz de hibridarse al menos con dos otros oligonucleótidos de acoplamiento simultáneamente. El soporte sólido puede estar compuesto de materiales tales como nitrocelulosa, una sustancia polimérica tal como poliacrilamida o dextrano, sustancias metálicas, o un cristal de poro controlado. El soporte puede tener forma de lámina, membrana o partícula.

Además, el soporte sólido puede tener carga magnética, para facilitar la recuperación de muestra, o para facilitar la eliminación, mediante lavado, de los ácidos nucleicos que no queden unidos, o de otros componentes de la muestra.

La unión del oligonucleótido inmovilizado con el soporte sólido puede lograrse mediante cualquier método que sea capaz de seguir fijando, a lo largo de todos los pasos del ensayo, el oligonucleótido inmovilizado. Además, es importante que, cuando se use un soporte sólido en un ensayo, sea esencialmente incapaz, en las condiciones del ensayo, de unirse de manera no específica con los oligonucleótidos o ácidos nucleicos no diana, así como que sea incapaz de adsorberlos.

En los métodos de inmovilización más habituales, se fija el ácido nucleico u oligonucleótido a nitrocelulosa, a un derivado de la celulosa o del nylon, o a otros materiales similares. Estos dos últimos materiales mencionados forman interacciones covalentes con el oligonucleótido inmovilizado, mientras que la nitrocelulosa se une al oligonucleótido inmovilizado mediante interacciones hidrófobas. Cuando se usan estos materiales, es importante emplear una solución “bloqueadora”, como las que contienen una proteína, por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés), o bien, emplear un ácido nucleico “portador”, por ejemplo, ADN de esperma de salmón, para que ocupen los restantes sitios disponibles en el soporte sólido antes de utilizar éste en el ensayo.

En otros métodos de inmovilización, para fijar el oligonucleótido al soporte sólido se puede usar un brazo de enlace, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS) y sus derivados. En los métodos de inmovilización, se usan habitualmente como soportes sólidos, entre otros, los siguientes: sílice, derivados de la poli(acrilamida), y sustancias metálicas. En dichos métodos, un extremo del brazo de enlace puede contener un grupo reactivo (por ejemplo, un grupo amida) que forma un enlace covalente con el soporte sólido, mientras que el otro extremo del brazo de enlace contiene otro grupo reactivo que puede unirse al oligonucleótido que se desea inmovilizar. En una forma de realización especialmente preferida, el oligonucleótido formará un enlace con brazo de enlace en su extremo 3'. El brazo de enlace es, preferible y básicamente, un hidrato de carbono de cadena recta que fija el oligonucleótido inmovilizado en una posición que está a una cierta distancia de la superficie del soporte sólido. No obstante, es posible usar enlaces no covalentes, por ejemplo, quelación o complejos antígeno-anticuerpo, para fijar el oligonucleótido al soporte sólido.

Una a forma de realización deseable de este último sistema de ensayo contiene dos oligonucleótidos de acoplamiento: (i) un primer oligonucleótido de acoplamiento que contiene una secuencia de nucleótidos que es esencialmente complementaria de la secuencia del oligonucleótido inmovilizado, por ejemplo, un primer oligonucleótido de acoplamiento con una secuencia de nucleótidos poli-A complementaria de una secuencia de nucleótidos poli-T del oligonucleótido inmovilizado, y (ii) un segundo oligonucleótido de acoplamiento que contiene una secuencia de nucleótidos que es esencialmente complementaria de la secuencia del ácido nucleico diana o de la secuencia de una sonda detectable, o de ambas secuencias. El segundo oligonucleótido de acoplamiento puede contener una secuencia de nucleótidos que es esencialmente complementaria de la secuencia del ácido nucleico diana. Además, en la forma de realización preferida, cada oligonucleótido de acoplamiento contiene otra secuencia de nucleótidos que permite que el primer y el segundo oligonucleótido de acoplamiento se hibriden entre sí en las condiciones del ensayo. No obstante, es posible introducir uno o más oligonucleótidos de acoplamiento adicionales, de manera tal que el primer y el segundo oligonucleótido de acoplamiento se unan indirectamente entre sí mediante estos oligonucleótidos de acoplamiento participantes adicionales. Los oligonucleótidos de acoplamiento adicionales serían esencialmente incapaces de hibridarse con el ácido nucleico diana, con la sonda de oligonucleótidos marcada detectable, o con el oligonucleótido inmovilizado, en las condiciones del ensayo.

Pero, otro sistema de ensayo que ofrece ventajas prácticas de facilidad de uso y de rapidez podría constar de un oligonucleótido inmovilizado que presente una porción complementaria a la secuencia de un oligonucleótido “de captura”. El oligonucleótido “de captura” (sonda de captura) contendrá una secuencia de bases que le permite hibridarse con la diana. Además, el oligonucleótido de captura tendrá un marcador fijado dentro de la región de la secuencia de nucleótidos que se une a la diana, o cerca de dicha región, y dicho marcador puede ser, por ejemplo, un éster de acridinio, sustituido o no sustituido, que se puede utilizar en un sistema de ensayo homogéneo o semihomogéneo con el que se pueden detectar ácidos nucleicos híbridos, de manera específica, sin detección de ácidos nucleicos monocatenarios, como lo es la propia sonda de captura. Un sistema de estas características preferido por el Solicitante es el HPA, que se ha indicado anteriormente en el presente documento. En el formato HPA, el marcador contenido en toda sonda de captura que no se haya hibridado con su correspondiente diana será hidrolizado mediante la adición de base, mientras que el híbrido diana:sonda de captura protegerá de la hidrólisis al marcador asociado a la sonda del híbrido.

Una ventaja de este último sistema de ensayo es que sólo es necesario que se produzca un evento de hibridación específico de diana (a saber, marcado del híbrido sonda de captura:diana) para que se pueda detectar la diana, en vez de los dos eventos de hibridación específicos de diana (formación del híbrido sonda de captura:diana y marcado del híbrido sonda:diana) que son necesarios en los demás procedimientos de procesamiento de muestras descritos en el presente documento. El uso de una menor cantidad de oligonucleótidos en el ensayo tenderá a hacer que éste sea más rápido y fácil de optimizar, ya que la velocidad global a la que se captura la diana marcada está limitada por la sonda que se hibrida más despacio. Además, aunque en estos ensayos no es necesario que la porción de la diana que es complementaria del oligonucleótido de captura sea tan específica como la región de unión de la diana con la sonda, la secuencia de bases de dicha porción debe ser lo suficientemente “rara” para evitar una saturación importante, con ácidos nucleicos no diana, de la sonda de captura. Por eso, la preferencia por el uso de dos secuencias diana específicas e independientes puede dificultar el hallazgo de una diana adecuada con la que dirigir tales ensayos. En cambio, en el ensayo preferido por el Solicitante, sólo es necesario hallar una secuencia diana adecuada, ya que la misma secuencia de nucleótidos actúa simultáneamente inmovilizando y detectando el ácido nucleico diana.

En cualquier caso, independientemente de qué abordaje se utilice, un elemento necesario en todo ensayo es un método de detección de la diana. Aquellos cualificados en la materia tienen a su disposición una serie de opciones. Una de tales opciones es el uso directo de una sonda de ácido nucleico marcada. Dicha sonda tendría una región dotada de una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria de la del ácido nucleico diana de interés, con el cual se puede hibridar de manera específica. Tras la hibridación con la diana y la inmovilización del híbrido diana:sonda, es posible eliminar, mediante lavado, la sonda no unida, o inactivarla, y luego se puede detectar o medir el marcador restante asociado al híbrido.

Otra opción que se puede utilizar combina los elementos de detección y de amplificación de ácidos nucleicos. En este sistema, se inmoviliza ácido nucleico diana de la manera en que se ha descrito, por ejemplo, y entre otras, de la manera empleada en los procedimientos de ensayo descritos anteriormente. Se puede hacer que, en condiciones de amplificación de los ácidos nucleicos (*por ejemplo*, en presencia de una o más polimerasas de ácidos nucleicos y de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos trifosfato), uno o más oligonucleótidos de amplificación (*véase, por ejemplo*, Kacian *et al*, WO93/22461), por ejemplo, un cebador, un cebador promotor, o una plantilla e ajuste, capaz de hibridarse con una región concreta del ácido nucleico diana, entre en contacto con el ácido nucleico diana inmovilizado.

Hibridando la cadena de polinucleótidos resultante (amplicón) con uno o más oligonucleótidos de amplificación en condiciones de amplificación de los ácidos nucleicos, puede hacerse que dicha cadena de polinucleótidos esté disponible para su hibridación específica con una sonda de ensayo de hibridación marcada, así como para la detección específica de dicha sonda marcada, o bien, para proseguir con la amplificación. Si se elige esto último, puede proseguirse con la reacción de amplificación hasta conseguir el grado de amplificación deseado, y luego pueden detectarse los amplicones resultantes (que pueden contener copias de al menos una porción del ácido nucleico diana inmovilizado, o polinucleótidos complementarios de al menos una porción del ácido nucleico diana inmovilizado, o ambas cosas) usando una o más sondas de oligonucleótidos marcadas. Si la reacción de amplificación debe tener lugar mientras la diana está inmovilizada, es importante que la porción de la molécula diana que se utilice como plantilla para los amplicones no contenga la región que presenta la secuencia de nucleótidos necesaria para la inmovilización del ácido nucleico diana. Aunque con las sondas marcadas se pueden detectar amplicones de cualquiera de los dos sentidos (“*senses*”), o amplicones de ambos sentidos, en una forma de realización preferida sólo se detectarán amplicones del sentido opuesto al de la diana inmovilizada, es decir, amplicones complementarios de ésta.

Un método heterogéneo de captura de la diana tal como el que se acaba de describir es especialmente ventajoso, ya que las muestras clínicas frescas pueden contener sustancias que inhiban la reacción de amplificación o que interfieran con ésta. Por ello, la capacidad para separar el ácido nucleico diana de tales sustancias interferentes puede permitir o aumentar la sensibilidad de la amplificación de los ácidos nucleicos.

Este esquema de amplificación asociada a fase sólida puede usarse en multitud de sistemas de ensayo, incluidos los descritos anteriormente en este documento. El Solicitante prefiere usar un sistema de ensayo en el que se empleen uno o más oligonucleótidos de acoplamiento, como los que se han descrito anteriormente, que sean capaces de fijar indirectamente el ácido nucleico diana al soporte sólido. También es preferible que las regiones con secuencia de nucleótidos complementaria del oligonucleótido acoplado al soporte, así como el oligonucleótido de captura diseñado para hibridarse con aquél, sean al menos parcialmente homopoliméricos o contengan secuencias de nucleótidos sencillas repetidas, para promover una hibridación rápida. Además, o como alternativa, estas regiones del oligonucleótido inmovilizado, del oligonucleótido de captura, o de ambos, pueden ser modificadas de manera acorde a lo expuesto en la presente invención, con el fin de incrementar la velocidad de hibridación entre ambos oligonucleótidos. En un sistema de ensayo de estas características, se deja que el oligonucleótido de captura de la diana y los ácidos nucleicos diana se hibriden preferiblemente en una solución, antes de realizar la hibridación con el oligonucleótido inmovilizado. En la forma de realización preferida actualmente, se lava el oligonucleótido inmovilizado, se hace que el oligonucleótido (u oligonucleótidos) de amplificación entre en contacto con la diana inmovilizada en condiciones de amplificación de los ácidos nucleicos, y tras la amplificación, se añade y se detecta la sonda marcada dirigida por los amplicones.

El Solicitante prefiere usar el método de amplificación basado en transcripción descrito en Kacian & Fultz, *citado anteriormente*. Con arreglo a dicho método, se hace que un cebador promotor que tiene una región 3' complementaria de una porción de la diana, y una región 5' y un cebador que tienen la misma secuencia de nucleótidos que una porción de la diana, entren en contacto con una molécula de ARN diana. El cebador y el cebador promotor definen los límites de la región de la diana que se desea amplificar, incluidos el sentido presente en la molécula diana y su complemento, y con ello, la longitud y la secuencia del amplicón. Puede hacerse que los oligonucleótidos de amplificación y el ARN diana inmovilizado entren en contacto en presencia de cantidades eficaces de transcriptasa inversa derivada del virus de la leucemia murina de Moloney y de ARN polimerasa T7, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos trifosfato, y las sales y cofactores necesarios a 42°C. En estas condiciones se produce la amplificación de los ácidos nucleicos, que genera predominantemente amplicones de ARN de un sentido opuesto al del ácido nucleico diana. Después, estos amplicones se detectan usando, por ejemplo, una sonda de ensayo de hibridación, marcada con éster de acridinio, que tenga el mismo sentido que el del ácido nucleico diana, en el ensayo de protección de la hibridación descrito en Arnold, *citado anteriormente*.

Se puede “taponar” o bloquear el extremo 3' del oligonucleótido inmovilizado, del oligonucleótido de captura y del oligonucleótido (u oligonucleótidos) de acoplamiento, con el fin de evitar o inhibir su uso como plantillas para la actividad de las polimerasas de ácidos nucleicos. Para realizar el taponamiento, se pueden añadir, en el extremo 3', 3'-desoxirribonucleótidos (por ejemplo, cordicepina), residuos 3',2'-didesoxinucleótidos, enlazadores no nucleotídicos como los descritos en Arnold *et al*, *citado anteriormente*, modificaciones alcanodiol, o residuos nucleotídicos no complementarios.

Aunque es posible hacer que los cebadores entren en contacto con la diana después de la inmovilización de la diana, pueden obtenerse ventajas en cuanto a la cinética de hibridación combinando el ácido nucleico diana y al menos un cebador complementario con éste al mismo tiempo que se añade el oligonucleótido de captura de la diana. El Solicitante cree que resulta ventajoso realizar la hibridación de la diana en una solución, antes de llevar a cabo la

inmovilización de la diana, ya que la hibridación puede producirse a una mayor velocidad en una solución que cuando un ácido nucleico está inmovilizado.

Igualmente, aunque el Solicitante prefiere formar y detectar amplicones de un sentido opuesto al de la diana, no hay motivos para no formar y detectar amplicones del otro sentido o de ambos sentidos. Además, cuando se amplifican ácidos nucleicos diana contenidos en muestras clínicas frescas, parece que es importante llevar a cabo un paso de lavado antes de llevar a cabo el paso de amplificación, con el fin de evitar la inhibición de las enzimas o la degradación de los ácidos nucleicos a causa de las sustancias presentes en la muestra.

Será evidente, para aquellos cualificados en la materia, que esta metodología es aplicable, de la forma descrita o incorporando modificaciones obvias, a otros diversos esquemas de amplificación, incluida la reacción en cadena de la polimerasa.

Oligonucleótidos modificados y procesamiento de muestras

En los métodos de procesamiento de muestras en los que se emplea la hibridación de ácidos nucleicos, incluidos los métodos de captura de diana descritos anteriormente, se pueden utilizar oligonucleótidos modificados capaces de hibridarse a una mayor velocidad con las dianas complementarias correspondientes. A la luz de la presente invención, se hará evidente que tales oligonucleótidos parcial o totalmente modificados pueden emplearse como sondas de ensayo de hibridación o como oligonucleótidos de amplificación en estos sistemas. Además, los oligonucleótidos parcial o totalmente modificados que presentan mayores velocidades de hibridación con la correspondiente diana pueden emplearse como oligonucleótidos inmovilizados, como oligonucleótidos de captura de la diana, o como uno o más oligonucleótidos de acoplamiento en ensayos heterogéneos en los que se haga uso de la hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, tales modificaciones pueden emplearse para reducir la duración total del ensayo o para posibilitar que los pasos de hibridación del ensayo discurran a una sola temperatura. Las ventajas que así se obtienen, en un entorno clínico, en cuanto a reducción de la duración y a facilidad del funcionamiento del ensayo serán evidentes para aquellos cualificados en la materia.

Asimismo, es posible modificar los oligonucleótidos de manera tal que presenten una cinética de hibridación o preferencias de equilibrio por un tipo concreto de ácido nucleico, como el ARN o el ADN. Por ejemplo, y tal como se ha descrito anteriormente en este documento, los 2'-O-metil-oligonucleótidos muestran preferencia por hibridarse con el ARN, en vez de con el ADN. De este modo, los oligonucleótidos de captura de la diana que contienen 2'-O-metil-nucleótidos pueden emplearse para capturar, de manera específica, ácidos nucleicos diana compuestos de ARN, por ejemplo, ARNm o ARNr, en condiciones de hibridación que no promueven la hibridación del oligonucleótido con la versión genómica de éste. Igualmente, pueden diseñarse oligonucleótidos de amplificación modificados en forma de 2'-O-metil-oligonucleótidos, o sondas marcadas compuestas por 2'-O-metil-oligonucleótidos, que tendrán como diana el ARN en vez del ADN, para la amplificación o detección, tal y como se ha descrito anteriormente.

Oligonucleótidos "helper" modificados

Los oligonucleótidos "helper" se describen en Hogan, *citado anteriormente*. Por lo general, los oligonucleótidos "helper" no van marcados, y se usan junto con sondas de ensayo de hibridación marcadas para aumentar la T_m y la velocidad de hibridación de la sonda marcada "abriendo" las regiones de la diana que presentan secuencias de nucleótidos que pueden participar en la estructura secundaria; de este modo, dichas regiones se tornan disponibles para su hibridación con la sonda marcada.

A la luz de la presente invención, aquellos cualificados en la materia se darán cuenta fácilmente de que el uso de oligonucleótidos "helper" modificados, que se hibridan a mayor velocidad con el ácido nucleico diana, frente al uso de sus análogos no modificados, puede llevar a velocidades de hibridación aún mayores de la sonda marcada con su diana. Por ello, en el ámbito de la presente invención se desean englobar métodos y composiciones para la detección de oligonucleótidos empleando tales oligonucleótidos "helper" modificados. Los oligonucleótidos "helper" preferidos presentan modificaciones que les dotan de una mayor avidez por el ARN que por el ADN. En una forma de realización preferida, tales modificaciones incluyen un racimo de al menos unos 4 2'-O-metil-nucleótidos. En una forma de realización particularmente preferida, tales modificaciones incluyen un racimo de unos 8 2'-O-metil-nucleótidos.

Kits de diagnóstico

Los métodos descritos en la presente invención favorecen claramente el diseño y uso de kits de diagnóstico especialmente formulados para su uso en tales métodos. Dichos kits contendrán uno o más oligonucleótidos que se usarán en un ensayo diagnóstico de hibridación de ácidos nucleicos. Al menos uno de dichos oligonucleótidos contendrá un racimo de al menos unos 4 nucleótidos modificados, diseñados para hibridarse con una región del ácido nucleico diana a una velocidad más alta que la velocidad a la que se hibridaría el mismo oligonucleótido no modificado.

Tales kits de diagnóstico pueden contener, entre otras, una o más combinaciones de los oligonucleótidos de la sonda, oligonucleótidos de amplificación, oligonucleótidos "helper", y oligonucleótidos para el procesamiento de muestras descritos en la presente invención.

El kit puede contener al menos una sonda de oligonucleótidos marcada que presente una región que contenga uno o más racimos de al menos unos 4 residuos nucleotídicos, modificados en 2', contiguos. La región puede contener uno o más racimos de unos 8 residuos nucleotídicos modificados en 2'.

- 5 Se puede usar un derivado del éster de acridinio como marcador no radiactivo, y añadirse un grupo metoxi como modificación. Al menos uno de los oligonucleótidos modificados puede contener uno o más racimos de unos 8 2'-O-metil-nucleótidos.

10 Los kits que contengan uno o más de los oligonucleótidos modificados descritos en la presente invención se podrían vender para su uso en cualquier tipo de método de ensayo de hibridación diagnóstico, o método de amplificación relacionado. En un ensayo de tales características, al menos uno de los oligonucleótidos modificados contenidos en el kit funcionaría como sonda capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana. Si se hace entrar en contacto la sonda modificada con una muestra que contenga el ácido nucleico diana, la sonda tendrá mejores propiedades de hibridación que una sonda no modificada que presente una secuencia de bases idéntica. Por ejemplo, la afinidad de unión de la
15 hibridación entre la diana y la sonda modificada será mayor que la afinidad de unión de la hibridación entre la diana y una forma no modificada de la sonda, en las mismas condiciones del ensayo de hibridación. Además, la velocidad de hibridación entre la diana y la sonda modificada será más alta que la velocidad de hibridación entre la diana y una forma no modificada de la sonda, en las mismas condiciones del ensayo de hibridación.

20 Con el fin de mejorar aún más las propiedades de hibridación de la sonda, se puede unir una o más moléculas de conjugado a aquella, preferiblemente en una región que contenga un racimo de al menos unos 4 nucleótidos modificados. También es de esperar que en el envase del kit se incluyan instrucciones para el uso de uno o más oligonucleótidos modificados en un ensayo de hibridación diagnóstico.

25 En la presente invención se describen métodos con los que aumentar tanto la avidez de unión como la velocidad de hibridación entre una sonda de ácidos nucleicos diagnóstica y el ácido nucleico diana correspondiente, mediante el uso de moléculas de sonda que contengan uno o más nucleótidos modificados, preferiblemente, un racimo de unos 4 o más nucleótidos modificados, y aún mejor, de unos 8 nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden consistir en modificaciones en la posición 2' del anillo del ribofuranosilo. Pueden consistir, además, en una sustitución 2'-O-metilo.
30

También se describe, en la presente invención, cómo proporcionar métodos para aumentar la velocidad de hibridación de un oligonucleótido monocatenario con ácido nucleico diana mediante la incorporación de una pluralidad de nucleótidos modificados a dicho oligonucleótido. Una mayor velocidad de hibridación lograda de esta manera será
35 más alta que la conseguida aumentando la temperatura, la concentración de sales o la concentración de los reactantes con el ácido nucleico.

Se describen asimismo métodos de diagnóstico dirigidos selectivamente contra el ARN en vez de contra el ADN, mediante el uso de oligonucleótidos modificados de manera tal que presentan una mayor eficiencia de unión con la
40 diana y que se hibridan con el ARN, en vez de con el ADN, a una velocidad más alta. Dichos oligonucleótidos pueden contener una modificación 2-O-metilo en el anillo del ribofuranosilo.

Se describen también métodos de procesamiento de muestras en los que se emplea un oligonucleótido inmovilizado que captura, directa o indirectamente, los ácidos nucleicos diana. En tales métodos pueden emplearse uno o más oligonucleótidos que se pueden hibridar de manera específica con el ácido nucleico diana, posibilitando así su detección e inmovilización. Un único oligonucleótido marcado puede ser el responsable tanto de la captura como de la detección de la diana. Se puede fijar un ácido nucleico de acoplamiento o puente tanto al oligonucleótido inmovilizado como al oligonucleótido responsable de la captura y detección de la diana. Es posible añadir ácidos nucleicos de acoplamiento adicionales. Algunos de los oligonucleótidos empleados en los métodos de procesamiento de muestras, o todos
50 los oligonucleótidos empleados en dichos métodos, pueden contener modificaciones que aumenten la velocidad de la hibridación específica con la diana.

Asimismo, en la presente invención se describen oligonucleótidos específicos de diana que contienen de unas 10 a unas 100 bases (preferiblemente, de unas 10 a unas 15 bases, y aún mejor, de unas 12 a unas 15 bases), que
55 contienen, preferiblemente, al menos un racimo de al menos unos 4 nucleótidos o, aún mejor, de unos 8 nucleótidos, modificados de tal modo que aumenta su eficiencia de unión específica con la diana, a la vez que aumenta su grado de discriminación entre las secuencias de nucleótidos diana y las secuencias de nucleótidos no diana, en comparación con oligonucleótidos más largos, no modificados, diseñados para hibridarse con el mismo sitio.

60 En la presente invención se describen, además, kits que presentan uno o más oligonucleótidos que contienen nucleótidos modificados que actúan aumentando la velocidad de hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana. Dichos kits podrían incluir una combinación cualquiera de oligonucleótidos de la sonda, oligonucleótidos de amplificación, oligonucleótidos "helper", y oligonucleótidos para el procesamiento de muestras. Los oligonucleótidos modificados de estos kits podrían contener al menos un racimo de unas 4 modificaciones 2'-O-metilo al anillo del ribofuranosilo. Los kits que contengan este tipo de oligonucleótidos modificados se podrían comercializar para su uso
65 en ensayos de hibridación diagnósticos y en ensayos de amplificación diagnósticos. Junto con tales kits pueden incluirse instrucciones por escrito en las que se indique a los profesionales cómo emplear los oligonucleótidos modificados en los ensayos de hibridación diagnósticos o ensayos de amplificación diagnósticos.

Es posible adaptar los métodos diagnósticos de manera que aprovechen las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos modificados, que tienen una mayor afinidad de unión. Dichos métodos pueden emplearse para la detección o la cuantificación de cualquier ácido nucleico dado. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico diana es ARN. En los métodos pueden emplearse oligonucleótidos “quiméricos”, compuestos de regiones de oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos, combinadas con regiones de oligonucleótidos modificados, o bien, pueden emplearse oligonucleótidos totalmente modificados. Es preferible que los oligonucleótidos no estén totalmente modificados. Se puede diseñar estas regiones para que simplemente promuevan una hibridación rápida de la sonda con la diana, o bien, para que, además, desempeñen otras funciones. Por ejemplo, se puede diseñar un oligonucleótido quimérico que se una tanto al ARN como al ADN. En tal caso, la región del oligonucleótido fijadora del ARN puede contener una pluralidad de nucleótidos modificados que se unen de manera preferente con la diana de ARN. Como alternativa, se puede diseñar la región de residuos nucleotídicos modificados de modo tal que esté dirigida contra una diana que esté presente en una cantidad escasa, con el fin de aumentar la velocidad de hibridación.

A la luz de la presente invención, se comprenderá que ciertos métodos y composiciones, incluidos los kits, harán uso de oligonucleótidos que presentan más de un tipo de modificación que afecta a las propiedades de hibridación del oligonucleótido resultante, es decir, a su T_m y su velocidad de hibridación. Tales modificaciones múltiples pueden actuar de forma cooperativa para aumentar aún más la velocidad de hibridación o para aumentar la especificidad del oligonucleótido resultante por un tipo de ácido nucleico diana dado, por ejemplo, ARN. Además, los oligonucleótidos quiméricos pueden presentar o constar de regiones de oligonucleótidos modificados de maneras diferentes, a saber, nucleótidos modificados en 2' o nucleótidos que presenten otras modificaciones, o ambos tipos de nucleótidos modificados.

Ejemplos

A menos que se indique de otro modo, en todos los siguientes ejemplos, los oligodesoxirribonucleótidos, oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados se sintetizaron usando las técnicas estándar de la fosforamidita, de las que los diversos métodos son bien conocidos en la disciplina. Véase, por ejemplo, Carruthers *et al*, volumen 154 de la revista *Methods in Enzymology*, 287 (1987). Asimismo, a menos que en el presente documento se indique de otro modo, los nucleótidos modificados eran 2'-O-metil-nucleótidos, que se usaron en la síntesis como sus análogos a base de fosforamidita. El Solicitante preparó los oligonucleótidos usando un Sintetizador de ADN Expedite 8909 (fabricante: PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, Estados Unidos).

Además, a menos que se indique de otro modo, los oligonucleótidos indicados como marcador contenían un éster de fenilo y acridinio. Los compuestos ésteres de fenilo y acridinio son derivados del acridinio que presentan un centro de nitrógeno cuaternario, así como derivados en la posición 9, que generan una fracción fenil éster. No obstante, en la disciplina son bien conocidos los grupos salientes que no son fracciones fenilo. Los ésteres de acridinio tienen la propiedad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, formando un anillo transitorio de dioxetano, en el que participa el carbono C-9 del anillo del acridinio, tras lo que se forma una acridona excitada. La relajación irradiativa de la acridona excitada produce luz. La síntesis de ésteres de acridinio, así como una descripción general de su uso como agentes marcadores quimioluminiscentes, se describe en Weeks *et al*, *Acridinium Esters as High Specific Activity Labels in Immunoassays*, *Clin. Chem.*, 29:1474-1478 (1984).

En estos Ejemplos, se fijaron los ésteres de acridinio, usando técnicas químicas estándar, a una unidad monomérica no formada por nucleótidos que tenía un “brazo de enlace”, compuesto de una amina primaria, que estaba unido a la fracción del éster de acridinio y que se inserta entre secuencias contiguas de nucleótidos durante la síntesis química de los oligonucleótidos, o que se coloca en una posición terminal del oligonucleótido. Véase Arnold *et al*, *Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes*, Número de publicación EPO 313219. No obstante, se comprenderá que la preferencia que los oligonucleótidos modificados en 2' presentan por las dianas de ARN, así como el efecto que los oligonucleótidos modificados tienen sobre la velocidad de hibridación con las dianas de ADN, no vienen determinadas por la presencia de un marcador ni por la naturaleza concreta de éste. Así, aquellos cualificados en la materia se darán cuenta de que los oligonucleótidos que se emplean en el uso de la presente invención pueden marcarse con varios marcadores diferentes, o no marcarse en absoluto.

Los derivados del éster de acridinio pueden fijarse al conjugado brazo de enlace:sonda de hibridación empleando técnicas bien conocidas en la disciplina. A este respecto, el Solicitante prefiere emplear los métodos que se describen en Nelson *et al*, *Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence in Non-Isotopic Probe Techniques* (Academic Press 1992) y en Arnold *et al*, *Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes*, Número de publicación EPO 313219.

Además, a menos que se indique de otro modo, todos los ácidos nucleicos diana eran ARN.

Ejemplo 1

Efecto de las modificaciones en 2' sobre la T_m de los híbridos sonda:diana

Se hibridaron individualmente sondas de oligonucleótidos de secuencias idénticas que contenían cantidades variables de 2'-O-metil-nucleótidos, de manera que fuesen perfectamente complementarias de dianas sintéticas de ARN de la misma longitud. A la secuencia de la sonda se le asignó el número identificador de secuencia SEQ ID NO: 1 y

ES 2 270 467 T3

a la secuencia de la diana se le asignó el número identificador de secuencia SEQ ID NO: 2. Las secuencias de bases nucleotídicas de estos oligonucleótidos eran las siguientes:

SEQ ID NO: 1 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

SEQ ID NO: 2 5'-ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGC-3'

Las sondas, como se ilustra a continuación, se sintetizaron de modo que: no contuviesen ningún 2'-O-metil-nucleótido (Sonda A); todos sus nucleótidos fuesen 2'-O-metil-nucleótidos (Sonda B); contuviesen una combinación de desoxinucleótidos y 2'-O-metil-nucleótidos (Sondas C, D y E). La Sonda C contenía cuatro desoxirribonucleótidos contiguos colocados directamente adyacentes a cada lado del sitio de acoplamiento del brazo de enlace; además, contenía 2'-O-metil-ribonucleótidos en todas las demás bases. La Sonda D contenía cuatro 2'-O-metil-nucleótidos contiguos colocados directamente adyacentes a cada lado del sitio de acoplamiento del brazo de enlace; además, contenía desoxirribonucleótidos en todas las demás bases. La Sonda E contenía ocho 2'-O-metil-nucleótidos contiguos colocados directamente adyacentes a cada lado del sitio de acoplamiento del brazo de enlace; además, contenía desoxirribonucleótidos en todas las demás bases. Se determinó la T_m de cada híbrido mediante un método quimioluminiscente y mediante un método óptico.

Método quimioluminiscente

Usando el método quimioluminiscente, se dejó que aproximadamente 1 pmol de la diana de ARN y 0,1 pmol de cada sonda de oligonucleótidos, marcados, como se ha descrito anteriormente, con éster de acridinio estándar (4-(2-succinimidiloxycarbonil etil)fenil-10-metilacridinio 9-carboxilato fluorosulfonato), se hibridasen a 60°C durante 60 minutos en 30 μ l de tampón succinato de litio (EDTA (ácido etilendiamino-tetracético) 1,5 mM, EGTA (ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetracético) 1,5 mM, lauril sulfato de litio 310 mM, succinato de litio 0,1 M (a pH = 5,2)). Después, la solución resultante se diluyó hasta 500 μ l con tampón succinato de litio, y se incubaron alícuotas de 50 μ l a diversas temperaturas durante 7 minutos. El éster de acridinio unido a las moléculas de sonda no hibridadas se hidrolizó añadiendo 150 μ l de una solución que contenía $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 190 mM (a pH = 7,6), TRITON® X-100 (polioxietilén p-t-octil fenol) al 7% (v/v), y gelatina al 0,02% (p/v), y se calentaron las muestras a 60°C durante 10 minutos. La quimioluminiscencia restante (asociada a los híbridos) de cada muestra se determinó en un luminómetro LEADER® 50 (fabricante: MGM Instruments, Hamden, Ct, Estados Unidos) mediante la inyección automática de una solución que contenía H_2O_2 al 0,1% (v/v) en HNO_3 0,001 M, seguida, de 0,5 a 2 segundos más tarde, de una inyección de 200 μ l de NaOH 1N. La emisión de luz resultante se integró a lo largo un intervalo de 2 segundos.

Método óptico

Usando el método óptico, se sintetizó un conjunto idéntico de sondas de oligonucleótidos que presentaban un brazo de enlace, pero que no fueron marcadas con éster de acridinio. Se dejó que cuatro microgramos de cada sonda de oligonucleótidos se hibridasen con 4 μ g de la diana de ARN complementaria durante 60 minutos a 60°C en 30 μ l de un tampón de hibridación que contenía hidróxido de litio 200 mM, EDTA 3 mM, EGTA 3 mM, lauril sulfato de litio al 17% (p/v), y ácido succínico 190 mM (a pH = 5,2). Después de la hibridación, se añadieron 600 μ l del tampón de hibridación, se dividió la muestra en dos, y se examinó el comportamiento de fusión de cada porción de la muestra usando un espectrofotómetro Beckman DU® 640 dotado de un accesorio con microceldas para el análisis de la T_m . Se varió la temperatura en 1°C por minuto en el caso de las temperaturas que eran 10°C superiores o inferiores a la T_m , y en 0,5°C por minuto, a intervalos de 0,2°C, en el caso de todas las demás temperaturas. Se realizó un seguimiento de los cambios en la hipocromaticidad y se registraron dichos cambios como función de la temperatura. Los resultados se presentan en la Tabla 1, a continuación.

TABLA 1

Sonda	Número de nucleótidos modificados	T_m (quimioluminiscente)	T_m (óptico)	ΔT_m
A	0	68	72,4	0
B	26	90	91,2	22; 18,8

ES 2 270 467 T3

C	18	83	87,9	15; 15,5
D	8	72	76,4	4; 4
E	16	nh	84,2	11,6

nh = no hecho

Como se aprecia en la Tabla 1, los datos de T_m generados usando los métodos quimioluminiscente y óptico fueron bastante similares. Los valores de T_m ligeramente menores observados con el método quimioluminiscente se pueden atribuir a las menores concentraciones de ácidos nucleicos empleadas en el método quimioluminiscente (en comparación con las empleadas en el método óptico). Los datos revelan que la sustitución de todos los residuos desoxirribonucleotídicos de la Sonda A con 2'-O-metil-nucleótidos (Sonda B) generó híbridos sonda:diana de ARN que presentaron un aumento de la T_m de unos 20,4°C. Las Sondas C, D y E presentaron aumentos de la T_m de 15°C, 4°C y 11,6°C, respectivamente. Calculando el efecto sobre la T_m de cada sustitución por un 2'-O-metil-nucleótido, los datos revelan que la T_m del híbrido 2'-O-metil-oligonucleótido:diana de ARN aumenta unos 0,8°C con cada sustitución. Este efecto es aproximadamente lineal a lo largo de la serie de sustituciones probadas.

Ejemplo 2

Efecto de los nucleótidos modificados en 2' sobre la T_m de los híbridos sonda:ARNr

Se sintetizaron tres conjuntos de sondas de oligonucleótidos, de diferente longitud y secuencia, y cada conjunto contenía dos oligonucleótidos de idéntica secuencia de bases. La Sonda F tenía 17 bases de longitud e incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base adenina. La Sonda G tenía 18 bases de longitud e igualmente incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base adenina. La Sonda H tenía 20 bases de longitud e incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base guanina.

Cada conjunto de sondas contenía un oligonucleótido compuesto enteramente de desoxirribonucleótidos y otro oligonucleótido que sólo contenía 2'-O-metil-nucleótidos. Se hibridó cada sonda con el ARN ribosómico correspondiente, y se determinó la T_m de los híbridos resultantes usando el método quimioluminiscente que se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 2, a continuación.

TABLA 2

Sonda	Longitud (bases)	T_m (desoxi)	T_m (2'-O- metil)	ΔT_m	ΔT_m por nucleótido modificado
F	17	63	81	18	1,05
G	18	66	78	12	0,66
H	20	62	75	13	0,65

Los datos confirman los resultados del Ejemplo 1, y muestran que sustituir un desoxirribonucleótido con un 2'-O-metil-nucleótido aumenta la T_m del híbrido sonda:diana de ARN resultante. Además, cuando se calcula en forma de promedio del aumento de T_m de las tres sondas por nucleótido modificado, la contribución de cada nucleótido modificado fue de un aumento de 0,8°C por nucleótido modificado.

Ejemplo 3

Efecto de los nucleótidos modificados en 2' sobre la T_m de los híbridos sonda:ADN

En este Ejemplo se evaluó el efecto de la modificación en 2' sobre los híbridos sonda:ADN. La Sonda I, que contenía cantidades variables de 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridó con una diana de ADN exactamente complementaria que presentaba la misma longitud, y se examinó, mediante el método quimioluminiscente que se ha descrito anteriormente, el comportamiento de fusión de los híbridos resultantes. La Sonda I tenía 29 bases de longitud e incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base guanina.

Se diseñó la Sonda I de manera que contuviese: (i) sólo desoxirribonucleótidos; (ii) sólo 2'-O-metil-nucleótidos; (iii) sólo 2'-O-metil-nucleótidos, excepto cuatro desoxirribonucleótidos, que se colocaron inmediatamente adyacentes a cada lado del sitio de fijación del marcador. Los resultados de la determinación de la T_m se presentan en la Tabla 3, a continuación.

TABLA 3

Sonda	Número de 2'-O-metil-nucleótidos	T_m	ΔT_m por nucleótido modificado
I	0	69	0
I	29	77	0,28
I	21	75	0,29

Como muestran los datos, la sustitución de los desoxirribonucleótidos por 2'-O-metil-nucleótidos en las dos últimas variaciones de la Sonda I hizo que la T_m del híbrido sonda marcada:diana de ADN aumentase aproximadamente 0,3°C por cada 2'-O-metil-nucleótido.

Se llevó a cabo una prueba similar empleando tres conjuntos de oligonucleótidos diferentes. Cada conjunto incluía dos oligonucleótidos; uno de dichos oligonucleótidos contenía desoxirribonucleótidos y el otro contenía un 100% de 2'-O-metil-nucleótidos; las secuencias de bases eran idénticas. La Sonda J tenía 16 bases de longitud e incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base adenina. La Sonda K tenía 18 bases de longitud e igualmente incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base adenina. La Sonda L tenía 29 bases de longitud e incluía un marcador a base de éster de acridinio, fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base guanina.

En cada uno de estos casos, las dianas de ADN sintético eran completamente complementarias de las sondas. Los resultados se presentan en la Tabla 4, a continuación.

TABLA 4

Sonda	Número de 2'-O-metil-nucleótidos	T_m (método óptico)	ΔT_m por nucleótido modificado
J	0	75,3	0
J	26	74,5	-0,03
K	0	71,6	0
K	19	67,0	-0,24
L	0	74	0
L	29	78,2	0,14

Los datos expuestos en las Tablas 3 y 4 demuestran que, cuando se introducen sustituciones 2'-O-metilo en las sondas, la T_m de las dianas de ADN aumenta mucho menos que la T_m de las dianas de ARN.

Ejemplo 4

Análisis de las estabildades de diferentes tipos de híbridos de ácidos nucleicos

Con el fin de comparar las estabildades relativas de híbridos que contenían diversas combinaciones de cadenas de ADN, ARN y 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridaron sondas de oligonucleótidos, marcadas con éster de acridinio, que presentaban la secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior), con dianas sintéticas que presentaban una secuencia de bases perfectamente complementaria. Las secuencias de las sondas y de las dianas contenían un 100% de

ribonucleótidos (ARN), o un 100% de desoxirribonucleótidos (ADN), o un 100% de 2'-O-metil-nucleótidos, formando las combinaciones que se indican en la Tabla 5. En dicha Tabla 5 (a continuación) se muestran las características de fusión de cada híbrido probado, determinadas usando el método quimioluminiscente o el método óptico. En la Tabla, cuando aparece más de un punto de datos, significa que se realizó un experimento independiente, duplicado.

TABLA 5

Sonda	Diana	T_m (quimioluminiscente)	T_m (óptico)
ADN	ARN	68, 67	73,3, 73,6, 73, 72,4
ARN	ARN	81	nd
2'-O-metil-nucleótidos	ARN	87, 90	91,2
2'-O-metil-nucleótidos	2'-O-metil-nucleótidos	91	nd
ADN	ADN	nd	75,5, 75,7, 75,1, 75,4
2'-O-metil-nucleótidos	ADN	nd	74,3, 74,8

nd = sin datos

De esta manera, este experimento indica que la estabilidad de los híbridos sonda marcada:diana sigue el orden: 2'-O-metil/2'-O-metil \geq 2'-O-metil/ARN > ARN/ARN > ADN/ADN > 2'-O-metil/ADN > ADN/ARN.

Ejemplo 5

Capacidad de la estabilidad mejorada de los híbridos oligonucleótido modificado en 2':ARN para posibilitar la detección específica de ARN

Como se ha indicado en el Ejemplo 4, los híbridos 2'-O-metil/ARN son considerablemente más estables que los híbridos 2'-O-metil/ADN. Para demostrar que esta diferencia en la estabilidad se puede aprovechar en un ensayo diagnóstico con el fin de detectar de manera específica moléculas de ARN, en vez de moléculas de ADN que tengan una secuencia idéntica (idéntica salvo por el hecho de que, en el ARN, el uracilo (U) ocupa las posiciones que la timidina (T) tiene en el ADN), se llevó a cabo el siguiente experimento.

Se dejó que una sonda de oligonucleótidos marcada con éster de acridinio, que presentaba una secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1, anteriormente en este documento) y que estaba compuesta de un 100% de 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridase con una diana de ARN o ADN sintético completamente complementaria. Dejando a un lado el hecho de que el oligonucleótido estaba marcado, la hibridación y la medición de la T_m fueron, por lo demás, iguales a lo descrito en el Ejemplo 1, Método Óptico. Los resultados se presentan en la Tabla 5 anterior, y se ilustran más detalladamente en la Figura 3.

Como se indica en la Figura 3, a 81,6°C el 2'-O-metil-oligonucleótido forma un híbrido, detectable, con la diana de ARN, y no con la diana de ADN. En cambio, como revela la Tabla 5, cuando se hibrida un oligonucleótido de ADN marcado de la misma secuencia con las dianas de ARN o ARN idénticas, los híbridos resultantes tienen características de fusión esencialmente similares.

Así, y conforme al aspecto de la presente invención demostrado aquí, es posible detectar de manera específica dianas de ARN, de manera preferente respecto de dianas de ADN, en condiciones de hibridación que se determinan con facilidad. Tales métodos se pueden usar, entre otras cosas, para detectar de manera específica diversas especies de ARN, tales como ARNm, ARNr o ARNt, sin que se produzca interferencia por parte de la secuencia idéntica que existe en el ADN genómico del organismo que se está sometiendo a ensayo. Dichos métodos pueden ser útiles para diversas aplicaciones, por ejemplo, para realizar un seguimiento de la tasa de expresión de un producto génico concreto. Aquellos cualificados en la materia se darán cuenta fácilmente de otras aplicaciones en las que se puede aprovechar esta capacidad que tienen los oligonucleótidos modificados en 2'.

Ejemplo 6

Efecto de los nucleótidos modificados en 2' sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos

5 El efecto de los nucleótidos modificados en 2' sobre la velocidad de hibridación se ilustró empleando cuatro métodos diferentes. Las moléculas de sonda utilizadas en este ejemplo se marcaron con éster de acridinio estándar, de la manera descrita anteriormente en este documento.

10 a) En el primer método, se hibridaron, durante un período de tiempo constante, 2 fmol de una sonda, marcada con éster de acridinio y que presentaba una secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior), con cantidades variables de una diana de ARN completamente complementaria; después, se realizó una hidrólisis diferencial y de-
 15 tección de la diana. La hibridación se llevó a cabo esencialmente de la misma manera que en el Ejemplo 1, Método quimioluminiscente, aunque con las diferencias que se indican a continuación. Se dejó que cantidades variables de diana de ARN se hibridasen con la sonda marcada, a 60°C durante 45 minutos. En la Figura 4 se muestran los re-
 20 sultados de este experimento; la sonda fue un oligonucleótido de ADN (sonda representada por cuadrados huecos), o bien, constó enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos (sonda representada por diamantes oscuros); estos resultados se presentan también en la Tabla 6, a continuación. El grado de hibridación se expresa en forma de unidades relativas de luz (rlu), que es una medición del número de fotones emitidos por el marcador éster de acridinio.

TABLA 6

Cantidad de diana (fmol)	rlu (sonda de ADN)	rlu (2'-O-metil)
1	855	1739
5	3394	8009
10	5476	14217
50	13810	27959
100	18798	34381
200	19199	31318

40 Los resultados indican que la velocidad de hibridación, como función de la concentración de diana, aumenta notablemente cuando la sonda contiene 2'-O-metil-nucleótidos en vez de nucleótidos no modificados. Esto es así en todo el intervalo de concentraciones de diana estudiado. Con fines comparativos, las pendientes iniciales de estos datos se emplean para calcular las velocidades de hibridación relativas de las sondas de desoxioligonucleótidos (pendiente = 1,0) y de 2'-O-metil- oligonucleótidos.

45 b) En un segundo método, se hibridó una cantidad constante (2 fmol) de la misma diana que la empleada en a) con cantidades variables de la sonda perfectamente complementaria, durante una cantidad fija de tiempo. En la Figura 5 se ilustran los resultados de este experimento; la sonda fue un oligonucleótido de ADN (sonda representada por cuadrados huecos), o bien, constó enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos (sonda representada por cuadrados oscuros).
 50 Los pasos de hibridación y de detección fueron los mismos que los descritos en a), salvo por el hecho de que la reacción de hibridación se llevó a cabo durante 30 minutos, en vez de durante 45 minutos. Los datos se presentan en la Tabla 7, a continuación.

TABLA 7

Cantidad de sonda (fmol)	rlu (sonda de ADN)	rlu (2'-O-metil)
0,2	99	346
0,5	309	966
1	690	1973
2	1206	4356
5	3227	9184
10	-5801	14615
20	7289	21515
50	13080	33236
100	15223	34930

De nuevo, los resultados de este ejemplo indican que la velocidad de hibridación, que es una función de la concentración de diana, aumenta notablemente cuando la sonda contiene 2'-O-metil-nucleótidos en vez de nucleótidos no modificados. Las pendientes de estos trazados son similares a las de la Figura 4, lo que indica que, independientemente de si se varía la concentración de sonda o la concentración de diana, la diferencia en la velocidad de hibridación entre las interacciones 2'-O-metil-nucleótidos/ADN y ADN/ADN sigue siendo la misma. En este experimento, la pendiente inicial de la reacción que contenía la sonda de ADN fue de 1,0, y la pendiente inicial de la reacción que contenía la sonda de 2'-O-metil-oligonucleótidos fue de 3,1.

c) Como tercera demostración de la capacidad de los oligonucleótidos modificados en 2' para aumentar la velocidad de hibridación, se dejó que cantidades fijas de sonda modificada o no modificada (1 fmol) y de diana (100 amol) se hibridasen durante cantidades de tiempo variables. Los protocolos de hibridación y de detección fueron, por lo demás, los mismos que en b). En la Figura 6 se ilustran los resultados; la sonda fue un oligonucleótido de ADN (sonda representada por cuadrados huecos), o bien, constó enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos (sonda representada por diamantes oscuros). Los datos se presentan en la Tabla 8, a continuación.

TABLA 8

Tiempo (minutos)	rlu (sonda de ADN)	rlu (2'-O-metil)
0	118	613
1	124	627
2	200	732
6,5	294	978
10,5	500	1331

De nuevo, las velocidades de hibridación relativas pueden determinarse a partir de las pendientes iniciales de las curvas (desoxioligonucleótidos = 1,0; 2'-O-metil-oligonucleótidos = 2,2). En este experimento, la pendiente inicial de la reacción que contenía el oligonucleótido de ADN fue de 1,0, y la pendiente inicial de la reacción que contenía la sonda de 2'-O-metil-oligonucleótidos fue de 2,2.

d) El cuarto método empleado para mostrar las diferencias existentes entre las velocidades de hibridación de las sondas modificada en 2' y no modificada fue un análisis de la C_0t . Se utilizaron sondas, marcadas con éster de acridinio, que presentaban una secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior). Se dejó que una cantidad fija de sonda y cantidades diversas de diana ("exceso de sonda"), o una cantidad fija de diana y cantidades diversas de sonda ("exceso

de diana”), se hibridasen a 60°C durante cantidades de tiempo diversas. La cantidad fija de sonda o de diana fue de 0,25 fmol, y las cantidades diversas de sonda o de diana fueron cantidades comprendidas en el intervalo de 0,25 a 50 fmol. Por lo demás, la hibridación se llevó a cabo como en el Ejemplo 1, Método Quimioluminiscente.

Se llevó a cabo una hidrólisis diferencial del éster de acridinio no hibridado, y una detección de la sonda hibridada, añadiendo a la muestra 150 μ l de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 190 mM (a pH = 7,6), TRITON® X-100 al 7% (v/v) y gelatina al 0,02% (p/v), y calentando la mezcla a 60°C durante 10 minutos. Se leyó la quimioluminiscencia en un luminómetro, tal y como se ha descrito anteriormente. El porcentaje máximo de hibridación se definió como la proporción formada por el valor observado de rlu dividido entre el valor máximo de rlu observado cuando se utilizaron cantidades saturantes de sonda o de diana en la reacción de hibridación.

En la representación de la C_0t que aparece en la Figura 7, se representa el logaritmo neperiano (\ln) de la cantidad frente a la concentración de diana multiplicada por el tiempo de hibridación. El valor H se define como el porcentaje de hibridación de la sonda a una concentración de diana dada, tras un tiempo dado.

En esta representación, las velocidades de hibridación relativas de las sondas de ADN y de 2'-O-metil-oligonucleótidos vienen dadas por la inversa de las proporciones relativas de la C_0t en el momento en el que se ha alcanzado el 50% de la hibridación ($\ln(1-0,5)$; desoxioligonucleótidos = 1,0, y 2'-O-metil-oligonucleótidos = 2,2).

En la Tabla 9 se presenta un resumen de las velocidades de hibridación relativas de una sonda marcada con éster de acridinio y que constaba enteramente de desoxirribonucleótidos o de 2'-O-metil-ribonucleótidos; se presentan los valores dichas velocidades de hibridación relativas, determinados empleando los cuatro métodos que se acaban de exponer. Los datos resultantes de estos experimentos indican que, a 60°C, un oligonucleótido compuesto enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos se hibrida 2,3 veces más deprisa que la sonda de desoxirribonucleótidos correspondiente.

TABLA 9

Método	Sonda (fmol)	Diana (fmol)	Tiempo de hibridación	Velocidad relativa (2'-O-metil-/desoxi-)
c	0,05	1	variable	2,3
c	10	0,5	variable	2,3
c	0,1	1	variable	2,0
c	1	0,2	variable	1,6
c	3	0,3	variable	2,9
c	10	1	variable	1,8
b	variable	1	30	2,6
b	variable	2	45	3,1
a	2	variable	45	2,5
d	0,25	variable	44	2,2

Ejemplo 7

Análisis cinético de la hibridación de los oligonucleótidos modificados en 2' con dianas adicionales

Con el fin de ampliar estas comparaciones de las velocidades de hibridación a las secuencias de otras sondas y dianas, se sintetizó la Sonda H descrita en el Ejemplo 2 anterior, de manera tal que constaba enteramente de desoxinucleótidos o de 2'-O-metil-nucleótidos, y se hibridó con ARNr en presencia de sondas “helper”. Como en el Ejemplo 6 (d), se llevó a cabo un análisis de la C_0t . Los resultados se presentan en la Tabla 10, a continuación.

TABLA 10

<u>Sonda</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>Velocidades relativas</u>
desoxi	0,3 x 10 ⁷	1,00
2'-O-metil	8 x 10 ⁷	3,75

En este Ejemplo, la sonda que constaba enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos se hibridó 3,75 veces más deprisa que la sonda de desoxirribonucleótidos de idéntica secuencia. Por lo tanto, el aumento de la hibridación por parte de las sondas marcadas con éster de acridinio que contienen 2'-O-metil-nucleótidos no parece estar limitada a ninguna secuencia de sonda o de diana concreta.

Ejemplo 8

Efecto de un aumento de la temperatura sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados en 2'

Como se ha mencionado anteriormente, cuando la temperatura aumenta, aumenta la velocidad de hibridación de los ácidos nucleicos. No obstante, las ventajas que ofrece este aumento de la velocidad de hibridación podrían verse contrarrestadas por los efectos desestabilizadores del aumento de la temperatura sobre la formación de dúplex, especialmente en ensayos diagnósticos y en procedimientos de amplificación de los ácidos nucleicos en los que se utilicen oligonucleótidos relativamente cortos (de entre unos 10 y unos 50 bases de longitud). Pero, como se expone a continuación, la mayor estabilidad que los oligonucleótidos modificados descritos en la presente invención proporcionan a los dúplex puede minimizar el efecto desestabilizador y posibilitar que la velocidad de hibridación sea aún mayor al llevar a cabo la hibridación a una temperatura mayor a la que de otro modo sería posible. De este modo, los oligonucleótidos modificados y la mayor temperatura de hibridación actúan conjuntamente para aumentar la velocidad de hibridación.

Se dejó que una sonda de oligonucleótidos, marcada con éster de acridinio, de secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo anterior), compuesta enteramente por 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridase con una diana de ARN perfectamente complementaria, de longitud idéntica a la descrita anteriormente. La hibridación y el protocolo de análisis de la C₀t fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 6(d), salvo por el hecho de que las temperaturas de hibridación fueron de 60°C o de 70°C. Como indican los datos que se presentan en la Tabla 11 (a continuación), cuando se aumentó la temperatura de hibridación del 2'-O-metil-oligonucleótido con su diana de 60°C a 70°C, la velocidad de hibridación aumentó 1,5 veces.

TABLA 11

<u>Temperatura de hibridación</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>Velocidades de hibridación relativas</u>
60°C	1,7 x 10 ⁻⁵	1
70°C	1,1 x 10 ⁻⁵	1,5

Ejemplo 9

Efecto de un aumento de la concentración de sales sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados en 2'

La velocidad de hibridación también se ve incrementada cuando aumenta la concentración de sales. El siguiente ejemplo ilustra el efecto de diversas concentraciones de sales, *por ejemplo*, LiCl, sobre la velocidad de hibridación de los 2'-O-metil-nucleótidos. Se dejó que una sonda, marcada con éster de acridinio, que presentaba una secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior) compuesta enteramente por 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridase a 80°C con una diana de ARN exactamente complementaria, de la misma longitud, de la manera descrita anteriormente en el Ejemplo 6(d); asimismo, se llevó a cabo un análisis de la C₀t (de la manera descrita anteriormente). La hibridación se llevó a cabo empleando dos concentraciones de LiCl diferentes. Como se presenta en la Tabla 12 (a continuación), cuando se aumentó la concentración de LiCl de 0,5 M a 1,0 M, la velocidad de hibridación aumentó 2,9 veces.

TABLA 12

<u>Concentración de LiCl</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>Velocidades relativas</u>
0,5 M	0,72 x 10 ⁻⁵	1
1,0 M	0,25 x 10 ⁻⁵	2,9

Estos resultados demuestran que, cuando se dobla la concentración de sales en una reacción de hibridación, la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados aumenta en un factor de 2,9.

Ejemplo 10

Efecto combinado de un aumento de la concentración de sales y de la temperatura sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados en 2'

Con el fin de demostrar el efecto que aumentar tanto la temperatura de hibridación como la concentración de sales tiene sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos modificados en 2', se llevaron a cabo las siguientes reacciones. Se dejó que, en un análisis de la C₀t, un oligonucleótido de ADN y un oligonucleótido marcado con éster de acridinio que constaba enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos, ambos de una secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior), se hibridasen, por separado, con una molécula diana de ARN exactamente complementaria. Las condiciones de hibridación fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 6(d). Las temperaturas de hibridación y las concentraciones de sales fueron las que se indican en la Tabla 13 (a continuación). Los resultados fueron los siguientes:

TABLA 13

<u>Sonda</u>	<u>Temperatura de hibridación</u>	<u>Concentración de LiCl</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>Velocidades relativas</u>
ADN	60°C	0,5 M	1,9 x 10 ⁻⁵	1
2'-O-metil	80°C	1,0 M	0,22 x 10 ⁻⁵	8,6

Como indican los datos, a una temperatura de hibridación de 80°C y en presencia de LiCl 1,0 M, el 2'-O-metil-oligonucleótido se hibridó con su diana a una velocidad 8,6 veces mayor que la velocidad a la que se hibridó el oligonucleótido de ADN correspondiente a una temperatura de 60°C en presencia de LiCl a una concentración de 0,5 M.

Ejemplo 11

Comparación de las velocidades de hibridación de oligonucleótidos de ARN, de ADN y modificados en 2' con dianas de ADN y de ARN complementarias

Se determinaron por separado las velocidades de hibridación relativas, con dianas de ADN y de ARN completamente complementarias, de ARN, ADN y oligonucleótidos modificados con 2'-O-metilo, marcados. La determinación de la velocidad se llevó a cabo de la manera descrita en el Ejemplo 6(c) o en el Ejemplo 6(d). Los oligonucleótidos marcados presentaban secuencias de bases idénticas (SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior)). Los resultados se presentan en la Tabla 14 (a continuación).

TABLA 14

<u>Sonda</u>	<u>Diana</u>	<u>Pendiente inicial</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>T_m</u>	<u>Velocidades relativas</u>
ADN	ADN	0,0031, 0,0048	---	75,4	4,4
ARN	ADN	---	---	74,5	---
2'-O-metil	ADN	0,0014, 0,0014	---	74,6	1,6
ADN	ARN	0,0009	---	73,3	1
ARN	ARN	---	1,1 x 10 ⁻⁵ , 1,4 x 10 ⁻⁵	81	2,8
2'-O-metil	ARN	0,004	0,71 x 10 ⁻⁵ , 0,89 x 10 ⁻⁵	91,2	4,4

Los experimentos representados por las filas 1 a 4 se llevaron a cabo de la manera descrita en el Ejemplo 6(c), empleando 3 fmol de sonda marcada y 0,3 fmol de diana. Los experimentos representados por las filas 5 y 6 se llevaron a cabo de la manera descrita en el Ejemplo 6(d). En los casos en los que en la tabla aparece más de un resultado, cada valor se corresponde con un experimento individual diferente.

Los resultados expuestos en la Tabla 14 muestran que la sustitución de los residuos desoxirribonucleotídicos por residuos 2'-OH (ARN) o 2'-O-metilo aumenta la afinidad de la sonda por la diana de ARN, así como la velocidad de hibridación de la sonda con la diana de ARN. En cambio, la sustitución de los residuos desoxirribonucleotídicos por residuos 2'-O-metilo no aumenta la afinidad de la sonda por la diana de ADN, ni la velocidad de hibridación de la sonda con la diana de ADN.

Los resultados presentados en la Tabla 14 revelan que la sustitución de los residuos desoxirribonucleotídicos por residuos 2'-O-metilo aumenta la afinidad de la sonda por la diana de ARN, así como la velocidad de hibridación de la sonda con la diana de ARN, pero no la afinidad de la sonda por la diana de ADN, ni la velocidad de hibridación de la sonda con la diana de ADN. No obstante, estos experimentos no eliminan la posibilidad de que el marcador éster de acridinio o el brazo de enlace por el que se fija a la sonda puedan ser los responsables de estas características de la velocidad de hibridación.

Con el fin de demostrar que ni el éster de acridinio ni el brazo de enlace afectan de manera apreciable a las velocidades de hibridación, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Se dejó que una sonda de ARN de secuencia SEQ ID NO: 1, marcada con éster de acridinio (véase el Ejemplo 1 anterior) y que contenía un brazo de enlace no nucleotídico que fijaba el marcador a la sonda, se hibridase con una diana exactamente complementaria compuesta enteramente por 2'-O-metil-nucleótidos o por desoxirribonucleótidos. La hibridación y el análisis de la C₀t se llevaron a cabo de la manera descrita en el Ejemplo 6(d). Los resultados se presentan en la Tabla 15 (a continuación).

TABLA 15

<u>Sonda marcada</u>	<u>Diana</u>	<u>C₀t_{1/2}</u>	<u>Velocidades relativas</u>
ARN	ADN	6,2 x 10 ⁻⁵	1
ARN	2'-O-metil-nucleótidos	2,3 x 10 ⁻⁵	2,7

Estos datos revelan que la sustitución de desoxirribonucleótidos por residuos 2'-O-metilo aumenta la velocidad de hibridación de un oligonucleótido que no contenga éster de acridinio o brazo de enlace. Por lo tanto, el aumento de la velocidad de hibridación que se observa en las sondas modificadas con 2'-O-metilo no se debe a la presencia de un marcador o de un brazo de enlace, sino que se trata de una propiedad intrínseca de los oligonucleótidos modificados con 2'-O-metilo.

Ejemplo 12

Efecto comparativo de las sondas "helper" sobre la hibridación, con una diana de ARNr, de sondas de mezclas de sondas de ADN y de mezclas de sondas modificadas en 2'

Como se describe en Hogan, *citado anteriormente*, la hibridación de algunas sondas con los ácidos nucleicos, especialmente con los que tienen una cantidad significativa de estructura secundaria, se ve facilitada por el uso de sondas adicionales, denominadas sondas "helper". Un ejemplo, entre otros, de una especie de ácido nucleico que presenta un alto grado de estructura secundaria, es el ARN ribosómico (ARNr). Las sondas "helper" pueden facilitar la alteración de la estructura secundaria que puede estar enmascarando la región diana. Habitualmente, la sonda "helper" está dirigida contra una región cercana a la secuencia que es la diana de la sonda; preferiblemente, no está solapada a dicha secuencia. En la práctica, por lo general no se marcan las sondas "helper", y se suelen usar en una concentración molar muy en exceso. El efecto que el uso de las sondas "helper" tiene sobre la hibridación de una sonda marcada se suele expresar como un aumento de la T_m y de la velocidad de hibridación en relación con el híbrido sonda marcada:diana.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para determinar si las sondas de oligonucleótidos modificados en 2' tienen los mismos requisitos, en cuanto a sondas "helper", que las sondas de ADN, cuando están dirigidas contra regiones diana dadas que presentan una gran cantidad de estructura secundaria. Se prepararon dos mezclas de sondas. Cada mezcla de sondas contenía las Sondas F, G y H del Ejemplo 2 descrito anteriormente. Los oligonucleótidos de una de las mezclas de sondas estaban compuestos de un 100% de 2'-O-metil-nucleótidos, y los oligonucleótidos de la otra mezcla de sondas estaban compuestos enteramente de desoxirribonucleótidos. Donde así se indica, las mezclas de sondas incluían las sondas "helper" de ADN no marcadas a, b, c, d, e y f, que tenían longitudes de 33, 36, 41, 31, 29 y 40 bases, respectivamente.

Cada sonda "helper" estaba dirigida contra secuencias de bases del ARNr cercanas al sitio diana de una de las sondas marcadas. El grado de hibridación se midió usando el ensayo de protección de la hibridación (HPA), tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresan en unidades relativas de luz (rlu).

Como se indica en la Tabla 16 (a continuación), en ausencia de sondas "helper" las mezclas de sondas de ADN se hibridaron escasamente con el ARNr. En cambio, cuando se hibridaron con el ARNr, en ausencia de sondas "helper", mezclas de sondas que contenían sondas de 2'-O-metil-oligonucleótidos que presentaban una secuencia idéntica a la de las mezclas de sondas de ADN, se observaron niveles de hibridación mucho mayores. Además, cuando se emplearon sondas "helper" junto con ambos tipos de mezclas de sondas, se produjo una hibridación mucho mayor de las sondas con sus dianas respectivas en el caso de las mezclas de sondas de oligonucleótidos modificados en 2'. Dado que la hibridación de una sonda de ADN con un ARNr depende en gran medida de la presencia de sondas "helper", mientras que la hibridación de una sonda idéntica, pero compuesta de 2'-O-metil-oligonucleótidos, no depende de dicha presencia de sondas "helper", las sondas de 2'-O-metil-oligonucleótidos pueden hibridarse eficazmente con moléculas de ARN altamente estructuradas, tales como el ARN ribosómico, en condiciones en las que las sondas de ADN no son capaces de hibridarse eficazmente con dichas moléculas de ARN altamente estructuradas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 16

<u>Sonda</u>	<u>Sondas "helper"</u>	<u>Concentraci ón de ARNr (amol)</u>	<u>rlu</u>
ADN	no	100	14
ADN	sí	100	3185
2'-O-metil	no	100	3116
2'-O-metil	sí	100	4332
ADN	no	1000	68
ADN	sí	1000	24912
2'-O-metil	no	1000	19934
2'-O-metil	sí	1000	33584
ADN	no	10000	730
ADN	sí	10000	204876
2'-O-metil	no	10000	148386
2'-O-metil	sí	10000	256940

Los datos expuestos en la Tabla 16 constituyen una demostración adicional de que, cuando se emplean oligonucleótidos modificados en 2', no es necesario utilizar sondas "helper" para facilitar la unión de la sonda. No obstante, utilizando sondas "helper" junto con las sondas de oligonucleótidos modificados en 2' se puede conseguir una sensibilidad incluso más alta que la descrita en los ensayos anteriores.

Ejemplo 13

Efecto comparativo de las sondas "helper" sobre la hibridación de una sola sonda de ADN y de una sola sonda de oligonucleótidos modificados en 2' con una diana de ARNr

Los resultados de los experimentos descritos en el Ejemplo 12 se generaron empleando tres sondas marcadas diferentes, en presencia o en ausencia de los seis oligonucleótidos "helper" indicados en el Ejemplo 12. En este Ejemplo 13, se dejó que las Sondas F y H del Ejemplo 2, que constaban enteramente de desoxirribonucleótidos o de 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridasen con un ARNr diana, en presencia o en ausencia de las sondas "helper" indicadas. Se utilizaron las sondas "helper" a, b, c y d del Ejemplo 12. En la Tabla 17 se muestran las características de hibridación del ADN y de los 2'-O-metil-oligonucleótidos de la Sonda F. En la Tabla 18 se muestran las características de hibridación del ADN y de los 2'-O-metil-oligonucleótidos de la Sonda H. Se evaluó cada sonda marcada en presencia o en ausencia de las diversas sondas "helper" y combinaciones de sondas "helper" indicadas.

TABLA 17

<u>Sonda</u>	<u>Concentraci ón de diana (amol)</u>	<u>Sondas "helper"</u>	<u>rlu</u>
desoxi	500	Ninguna	153

ES 2 270 467 T3

desoxi	500	a	5600
desoxi	500	b	761
desoxi	500	a y b	9363
2'-O-metil	500	Ninguna	14537
2'-O-metil	500	a	16556
2'-O-metil	500	b	15586
2'-O-metil	500	a y b	16868
desoxi	1000	Ninguna	1060
desoxi	1000	a	14782
desoxi	1000	b	316
desoxi	1000	a y b	26877
2'-O-metil	1000	Ninguna	28874
2'-O-metil	1000	a	23201
2'-O-metil	1000	b	16269
2'-O-metil	1000	a y b	44510

TABLA 18

<u>Sonda</u>	<u>Sondas "helper"</u>	<u>rlu</u>
desoxi	c	870
desoxi	d	9176
desoxi	c y d	47745
2'-O-metil	c	88292
2'-O-metil	d	69943
2'-O-metil	c y d	98663

Las Tablas 17 y 18 muestran que las sondas de ADN marcadas precisaron de oligonucleótidos "helper" para poder hibridarse eficazmente con sus dianas en las condiciones del ensayo. Además, la Tabla 18 muestra que los oligonucleótidos modificados en 2' se hibridaron con sus dianas, en ausencia de sondas "helper", en mayor medida que los oligonucleótidos de ADN con la misma diana y en presencia de los oligonucleótidos "helper" añadidos. Por último, los 2'-O-metil-oligonucleótidos se caracterizaron por propiedades de hibridación aún mayores en presencia de los oligonucleótidos "helper".

Ejemplo 14

Efecto comparativo de la temperatura sobre las propiedades de la hibridación de las sondas de ADN y de las sondas de oligonucleótidos modificados en 2' con una diana de ARNr en presencia y en ausencia de sondas "helper"

Los datos presentados en el Ejemplo 13 indican que los 2'-O-metil-oligonucleótidos se hibridan en un grado detectable con las dianas de ARN, incluso con estructuras muy plegadas como el ARNr, en ausencia de sondas "helper". No obstante, las sondas "helper" pueden acelerar la hibridación de los 2'-O-metil-oligonucleótidos con el ARN altamente

estructurado. Con el fin de evaluar más de cerca el efecto de las sondas "helper", se hibridaron sondas de desoxi-
 oligonucleótidos y de 2'-O-metil-oligonucleótidos con ARNr, a diferentes temperaturas y en presencia o en ausencia de
 sondas "helper". La Tabla 19 representa estudios llevados a cabo empleando sondas marcadas con éster de acridinio
 que presentaban la secuencia de nucleótidos de la Sonda F del Ejemplo 2 anterior, y empleando asimismo las sondas
 "helper" c y d del Ejemplo 12 anterior. La Tabla 20 representa estudios llevados a cabo empleando sondas marcadas
 con éster de acridinio que presentaban una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior), y
 empleando asimismo sondas "helper" g y h, de 41 y 32 bases respectivamente.

TABLA 19

Sonda	Sondas "helper"	Temperatura	$C_0t_{1/2}$	Velocidad relativa
desoxi	Sí	60°C	$26,4 \times 10^{-5}$	1,3
2'-O-metil	No	60°C	35×10^{-5}	1
2'-O-metil	Sí	60°C	$8,15 \times 10^{-5}$	4,3
2'-O-metil	No	75°C	$12,9 \times 10^{-5}$	2,7
2'-O-metil	Sí	75°C	$4,12 \times 10^{-5}$	8,5

TABLA 20

Sonda	Sondas "helper"	Temperatura	$C_0t_{1/2}$	Velocidad relativa
2'-O-metil	No	60°C	$7,46 \times 10^{-5}$	1
2'-O-metil	Sí	60°C	$1,77 \times 10^{-5}$	4,2

Estos experimentos demuestran que, a 60°C y a 75°C, las sondas "helper" aumentaron las velocidades de hibrida-
 ción de las sondas de 2'-O-metil-oligonucleótidos con sus dianas, en un factor de 3,1 a 4,3.

Ejemplo 15

Efecto de los 2'-O-metil-nucleótidos sobre las propiedades de hidrólisis de sondas marcadas con éster de acridinio

Como demostración adicional del efecto de los oligonucleótidos modificados sobre las características de eficacia
 de las moléculas sonda diagnósticas, se llevó a cabo una serie de otros experimentos. Dichos experimentos se basa-
 ron en el método de detección preferido del Solicitante, en el que se emplea el ensayo de detección HPA. Conforme
 al formato HPA, se fija un éster de acridinio quimioluminiscente a una sonda, y se hibrida la sonda con un analito.
 Después de la hibridación, la quimioluminiscencia asociada a la sonda que no ha quedado hibridada es destruida selec-
 tivamente mediante una breve hidrólisis en tampón borato. Puesto que en este proceso no se destruyen las moléculas
 sonda:analito, la quimioluminiscencia restante de la sonda hibridada es una medición directa del analito que está pre-
 sente en la muestra. En esta aplicación, son preferibles las sondas marcadas con éster de acridinio que se hidrolizan
 más deprisa cuando no están hibridadas que cuando están formando un complejo de híbrido sonda:analito. La hidró-
 lisis de la sonda y del híbrido es de "pseudo primer orden" y se puede caracterizar con el valor $t_{1/2}$, que es el tiempo,
 medido en minutos, que se requiere para hidrolizar el 50% del éster de acridinio fijado a la sonda o al híbrido. Así, son
 altamente deseables las sondas que muestran una proporción de hidrólisis diferencial (DH, por sus siglas en inglés)
 grande ($t_{1/2}$ (híbrido) / $t_{1/2}$ (sonda)).

Con el fin de evaluar el efecto de los oligonucleótidos modificados sobre las propiedades de hidrólisis de las sondas
 marcadas con éster de acridinio, se construyeron cuatro conjuntos de sondas; cada conjunto de sondas presentaba una
 secuencia de bases nucleotídicas bien diferenciada, y las sondas miembro de cada conjunto presentaban secuencias de
 bases nucleotídicas idénticas entre sí. Cada conjunto de sondas contenía una sonda compuesta enteramente de nucleó-
 tidos no modificados y otra sonda compuesta enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos. Las sondas que se emplearon
 fueron las Sondas A y B del Ejemplo 1 (véase anteriormente en este documento) y las Sondas F, G y H del Ejemplo 2.
 Las proporciones de DH de cada sonda respecto de una diana de ARN exactamente complementaria se determinaron
 de la manera descrita anteriormente, por ejemplo, en el Ejemplo 1. Como se presenta en la Tabla 21 (a continuación),
 las sondas no hibridadas que contenían desoxinucleótidos o 2'-O-metil-nucleótidos se hidrolizaron a velocidades muy
 similares.

TABLA 21

	Sonda	Ribonucleótidos	$t_{1/2}$ (sonda)	$t_{1/2}$ (híbrido)	DH
5	A	desoxi	0,81	49,1	60,3
	B	2'-O-metil	0,63	77,2	123,5
10	B	F	desoxi	0,36	20,79
	F	2'-O-metil	0,89	75,25	4,55
15	C	H	desoxi	0,69	17,26
	H	2'-O-metil	0,76	44,7	58,8
20	D	G	desoxi	0,62	25,67
	G	2'-O-metil	0,81	23,55	29,7

En cambio, en tres de las secuencias, el marcador asociado al híbrido sonda modificada:diana fue aproximadamente dos veces más resistente a la hidrólisis que el asociado al híbrido sonda no modificada:diana (idéntico salvo por el hecho de que la sonda no estaba modificada). En uno de los casos, en el que la sonda contenía una secuencia ATAT en torno al brazo de enlace del éster de acridinio, la proporción de DH del marcador asociado al híbrido sonda modificada:diana disminuyó en un factor de 1,4.

Ejemplo 16

Efecto de la posición de los nucleótidos modificados en 2' sobre las propiedades de hidrólisis de sondas marcadas con éster de acridinio

Con el fin de determinar si los nucleótidos modificados deben estar cerca del sitio de fijación del marcador para poder mejorar el comportamiento de DH del éster de acridinio, se hibridaron con una diana de ARN complementaria sondas marcadas con éster de acridinio, de secuencia SEQ ID NO: 1 y que contenían racimos de 2'-O-metil-nucleótidos en diferentes posiciones en relación con el sitio de de enlace del éster de acridinio. Los nucleótidos que contenían sustituciones 2'-O-metilo se indican a continuación mediante un subrayado:

Sonda M: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda N: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda O: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda P: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Como se ilustra en la Tabla 22 (a continuación), las mediciones revelan que cuatro 2'-O-metil-nucleótidos a un lado o al otro del sitio de enlace del éster de acridinio son suficientes para mejorar el comportamiento de DH de una sonda marcada con éster de acridinio tanto como una sonda compuesta enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos. En la Tabla, cuando aparece más de un punto de datos, significa que se realizaron experimentos independientes, duplicados.

TABLA 22

Sonda	$t_{1/2}$ (sonda)	$t_{1/2}$ (híbrido)	DH
M	0,82, 0,8	48,7, 43,2	59,7, 54
N	0,76, 0,6	90, 77,6	118,3, 129
O	0,74	49,8	67,3
P	0,44	81,4	185

Ejemplo 17

Efecto de la temperatura sobre las propiedades de hidrólisis de sondas de oligonucleótidos modificados en 2' marcadas con éster de acridinio

Como se ha mencionado anteriormente, gracias a su mayor estabilidad térmica, los oligonucleótidos modificados objeto de la presente invención son capaces de hibridarse a una temperatura más alta que los oligonucleótidos no modificados. Cabría esperar que, a esas temperaturas más altas, la velocidad de hibridación, así como la velocidad de otras reacciones, aumentase. Entre tales otras reacciones tenemos la velocidad de la hidrólisis de los marcadores a base de éster de acridinio. Puesto que en el método de detección preferido por el Solicitante se emplea el ensayo de protección de la hibridación (HPA), descrito anteriormente en este documento, se llevó a cabo el siguiente experimento con el fin de determinar si, a tales temperaturas más altas, las ventajas del ensayo diagnóstico, conferidas por un aumento de la velocidad de hibridación, se verían contrarrestadas por una disminución de las proporciones de DH de los marcadores a base de éster de acridinio asociados y no asociados a los híbridos.

Se dejó que una sonda marcada con éster de acridinio, compuesta enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos, se hibridase, a 60°C, 70°C y 80°C, con una diana de ARN complementaria. Las condiciones de hibridación fueron, por lo demás, las mismas que las que se han descrito anteriormente.

Como se presenta de forma resumida en la Tabla 23 (a continuación), a 70°C y a 80°C las sondas marcadas con éster de acridinio compuestas de 2'-O-metil-nucleótidos, mostraron proporciones de DH comparables a las que mostraron, a 60°C, las sondas marcadas con éster de acridinio compuestas de desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, en ensayos diagnósticos en los que se empleen los métodos y las composiciones objeto de la presente invención, se puede utilizar la temperatura más alta (el aumento de temperatura) resultante sin que se produzca una disminución detectable en la sensibilidad del ensayo a causa de la degradación del marcador.

TABLA 23

Temperatura (°C)	Sonda	$t_{1/2}$ (sonda)	$t_{1/2}$ (híbrido)	DH
60	desoxi	0,82	48,7	59,7
60	2'-O-metil	0,76	90	118
70	2'-O-metil	0,42	25,7	61,3
80	2'-O-metil	0,25	10,1	40,8

Ejemplo 18

Efecto de los nucleótidos modificados en 2' sobre las propiedades de hidrólisis de diversas sondas marcadas con éster de acridinio

Los experimentos que se han expuesto se llevaron a cabo empleando éster de acridinio estándar como el marcador quimioluminiscente detectable. Con el fin de evaluar si el comportamiento de hidrólisis diferencial de marcadores que no sean el éster de acridinio estándar se ve mejorado por nucleótidos modificados que aumentan la T_m , se marcaron exactamente de la misma manera y en la misma posición (véase el Ejemplo 1 anterior) sondas de secuencia SEQ ID NO: 1, que contenían desoxinucleótidos o 2'-O-metil-nucleótidos, y se evaluó su comportamiento de DH. Los marcadores que se emplearon fueron: éster de acridinio estándar, o-diBr-éster de acridinio, 2-Me-éster de acridinio, naftil-éster de acridinio, o-F-éster de acridinio, 2,7-diisopropil-éster de acridinio, o una mezcla de 1- y 3-Me-éster de acridinio.

(Nota: Me = Metil)

Véanse, en la Figura 1, ejemplos de ésteres de acridinio. Como se presenta de forma resumida en la Tabla 24 (a continuación), el uso de sondas de nucleótidos modificados produjo un aumento de la proporción de DH en todos los derivados del éster de acridinio que se sometieron a prueba, en un factor de 1,1 a 6.

ES 2 270 467 T3

TABLA 24

Marcador	Sonda	$t_{1/2}$ (sonda)	$t_{1/2}$ (híbrido)	DH
Éster de acridinio estándar	desoxi	0,81	49,1	60,3
Éster de acridinio estándar	2'-O-metil	0,63	77,2	123,5
o-diBr-éster de acridinio	desoxi	0,94	23,44	24,94
o-diBr-éster de acridinio	2'-O-metil	1,01	66,65	66
2-Me-éster de acridinio	desoxi	0,84	73,6	87,62
2-Me-éster de acridinio	2'-O-metil	0,78	101,8	130,5
Naftil-éster de acridinio	desoxi	0,72	14,45	20,07
Naftil-éster de acridinio	2'-O-metil	0,57	53,4	93,68
o-F-éster de acridinio	desoxi	0,93	53,3	57,3
o-F-éster de acridinio	2'-O-metil	1,03	78,75	76,46
2,7-diisopropil-éster de acridinio	desoxi	1,23	38,55	31,3
2,7-diisopropil-éster de acridinio	2'-O-metil	0,8	43,90	54,9
Mezcla de 1- y 3-Me-éster de acridinio	desoxi	0,97	12,6	129,8
Mezcla de 1- y 3-Me-éster de acridinio	2'-O-metil	1,24	149,5	120,6

Ejemplo 19

Relación entre la velocidad de hibridación y el número de nucleótidos modificados en 2' contenidos en la secuencia de una sonda

Con el fin de estudiar relación existente entre la velocidad de hibridación y el número de 2'-O-metil-nucleótidos contenidos en la secuencia de una sonda, se sintetizaron sondas marcadas con éster de acridinio que presentaban la secuencia SEQ ID NO: 1 (véase el Ejemplo 1 anterior). Estas sondas sintetizadas contenían cantidades crecientes de residuos modificados con 2'-O-metilo (las bases que aparecen subrayadas a continuación indican la presencia de residuos modificados con 2'-O-metilo), a ambos lados del sitio de enlace del éster de acridinio (EA):

Sonda Q: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda R: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda S: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda T: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda U: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Sonda V: 5'-GCTCGTTGCG GGACTT(EA)AACC CAACAT-3'

Los resultados se presentan de forma resumida en la Tabla 25 (a continuación).

TABLA 25

Residuos modificados con 2'-O- metilo	C ₀ t (Exp 1)	C ₀ t (Exp 2)	C ₀ t (Exp 3)	Velocidad relativa
0	1,87 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁵	---	1
2	---	---	1,13 x 10 ⁻⁵	1,8
4	1,28 x 10 ⁻⁵	---	0,93 x 10 ⁻⁵	1,8
8	---	0,93 x 10 ⁻⁵	0,86 x 10 ⁻⁵	2,3
16	---	---	0,96 x 10 ⁻⁵	2,1
25	0,91 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	0,84 x 10 ⁻⁵	2,2

De los resultados presentados en la Tabla 25, se desprende que fueron suficientes tan solo ocho 2'-O-metil-nucleótidos (Sonda T) - cuatro a cada lado del sitio de enlace del éster de acridinio - para aumentar la velocidad de hibridación de una sonda marcada con éster de acridinio hasta el mismo nivel (la misma velocidad) que una sonda compuesta casi enteramente de 2'-O-metil-nucleótidos (Sonda V). En cambio, la T_m de una sonda que contenía cuatro 2'-O-metil-nucleótidos a cada lado del sitio de enlace del éster de acridinio es inferior a la T_m de un híbrido sonda:diana que contenga 2'-O-metil-nucleótidos adicionales. Por lo tanto, conforme a la presente invención es posible optimizar, o "ajustar", la eficacia de una sonda marcada con éster de acridinio, en cuanto a su velocidad de hibridación, hidrólisis diferencial y propiedades de fusión. Por ejemplo, una sonda marcada con éster de acridinio que contenga cuatro 2'-O-metil-nucleótidos a cada lado del sitio de enlace del éster de acridinio tendrá su velocidad de hibridación y sus propiedades de hidrólisis diferencial maximizadas de forma óptima, mientras que un híbrido que contenga esta sonda mostrará un sólo aumento pequeño de su temperatura de fusión.

A medida que se añadan 2'-O-metil-nucleótidos esencialmente contiguos que reemplacen a los desoxirribonucleótidos en la sonda marcada, la velocidad de hibridación y las propiedades de hidrólisis diferencial del híbrido sonda:diana se mantendrán esencialmente constantes, mientras que su T_m seguirá aumentando. La capacidad para ir aumentando, incrementalmente, la influencia de una sonda sobre la T_m del híbrido sonda:diana, permite ajustar la especificidad de una sonda, de manera tal que no se produzcan reacciones cruzadas entre dicha sonda y secuencias estrechamente relacionadas, como se ha expuesto en la Tabla 25.

Ejemplo 20

Efecto de las modificaciones propino (metilacetileno) sobre la T_m de los híbridos sonda:diana

Con el fin de ilustrar la utilidad general de las composiciones y métodos objeto de la presente invención en la aplicación diagnóstica de la tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, se construyeron oligonucleótidos que presentaban una modificación que no consistía en una modificación en 2' de la fracción ribofuranosilo, pero que también generaban un aumento de la afinidad de unión de una sonda con su diana. En este ejemplo, se sintetizaron oligonucleótidos que contenían dos nucleótidos modificados a nivel de la base nitrogenada. Concretamente, N-diisobutylaminometilideno-5-(1-propinil)-2'-desoxicidina (un análogo de la citidina); y 5-(1-propinil)-2'-desoxiuridina (un análogo de la timidina). Estos análogos de nucleótidos están disponibles en el mercado y se pueden adquirir, por ejemplo, de Glen Research (Sterling, VA, Estados Unidos).

Como primera consideración, se hibridaron con ARNr, en presencia de sondas "helper", sondas que presentaban 22 bases y un éster de acridinio fijado en un sitio ubicado entre una base timina y una base guanina en las sondas W e Y, y entre dos bases timina en la sonda X, pero que contenían números variables de nucleótidos modificados con propino (metilacetileno). Esta hibridación se llevó a cabo con el fin de evaluar el efecto de la modificación que se acaba de describir sobre la T_m de los híbridos marcados con éster de acridinio. La Sonda W no contenía modificaciones propino.

ES 2 270 467 T3

La Sonda X contenía dos modificaciones propino, cada una de ellas directamente adyacente a cada lado del sitio de unión del marcador. La Sonda Y contenía once modificaciones propino, incluidas cuatro modificaciones contiguas directamente adyacentes en el lado 5' respecto del sitio de unión del marcador y siete modificaciones ubicadas en bases que distaban 3, 4, 6, 9-11 y 14 bases del sitio de unión del marcador (en el lado 3' respecto de éste).

Se realizaron determinaciones de la hibridación y de la T_m , de la manera descrita anteriormente en este documento haciendo uso de la detección de los híbridos marcados con éster de acridinio. Como se presenta de forma resumida en la Tabla 26 (a continuación), los datos indican que la T_m del oligonucleótido, cuando se hibridó con una diana de ARN, aumentó 1°C (como promedio) por cada reemplazo de una pirimidina con una pirimidina sustituida con propino.

TABLA 26

Sonda	Residuos propino	T_m (método quimioluminiscente)	$\Delta T/\text{propino}$
W	0	71	---
X	2	72	0,5
Y	11	82	1,0

Ejemplo 21

Efecto de las modificaciones propino (metilacetileno) sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos

Con el fin de estudiar el efecto de los grupos propino (metilacetileno) sobre la velocidad de hibridación de los oligonucleótidos, se determinó, mediante análisis de la C_0t (de la manera descrita en el Ejemplo 6), la velocidad de hibridación de las sondas marcadas con propino (descritas en el Ejemplo 20 anterior) con el ARN. Como se presenta de forma resumida en la Tabla 27 (a continuación), la sonda que contenía dos grupos propino (Sonda W) se hibridó a la misma velocidad que la sonda que no contenía ningún grupo propino (Sonda X), mientras que la sonda que contenía once grupos propino (Sonda Y) se hibridó 1,9 veces más deprisa.

TABLA 27

Sonda	$C_0t_{1/2}$	Velocidad relativa
W	$0,75 \times 10^{-5}$	1
X	$0,81 \times 10^{-5}$	0,93
Y	$0,39 \times 10^{-5}$	1,9

Estos datos refrendan la generalidad de la presente invención, ya que demuestran que, cuando se modifican los oligonucleótidos de modo tal que la T_m aumenta, también aumenta la velocidad a la que el oligonucleótido modificado se hibrida con su diana, en comparación con un oligonucleótido no modificado de idéntica secuencia de bases. Además, este ejemplo demuestra que tales modificaciones pueden realizarse en la fracción de bases nitrogenadas, además de en la fracción de azúcar. Aquellos cualificados en la materia se darán cuenta de que dichas modificaciones pueden realizarse asimismo en las uniones entre nucleótidos.

Aunque en la discusión anterior se han descrito las formas de realización preferidas de la presente invención, el Solicitante no se limita a éstas. Aquellos cualificados en la materia a quienes resulta aplicable esta invención concebirán formas de realización adicionales a la luz de este descubrimiento. Además, en las reivindicaciones que conforman la conclusión de esta invención y sus equivalentes se incluyen formas de realización adicionales.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un oligonucleótido modificado con 2'-O-metilo, con una secuencia de nucleótidos conocida, como sonda para una secuencia diana plegada que consta de ARNr, ARNt o ARN vírico, presente en una muestra que contiene ácido nucleico no diana; dicho oligonucleótido modificado tiene más de 4 nucleótidos contiguos modificados de manera tal que incluyen una sustitución 2'-O-metilo, y la velocidad de hibridación entre el oligonucleótido modificado y la diana es mayor que la velocidad de hibridación que se da entre el oligonucleótido no modificado y la diana.

2. El uso conforme a lo expuesto en la reivindicación 1, en el que esencialmente todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados.

3. El uso conforme a lo expuesto en las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se usa una sonda "helper", no marcada, junto con el oligonucleótido modificado.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se modifica una fracción ribofuranosilo del oligonucleótido.

5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se fija el oligonucleótido a una molécula de conjugado, y dicha molécula de conjugado actúa incrementando la afinidad de unión de dicho oligonucleótido por la diana y la velocidad de hibridación de dicho oligonucleótido con la diana, y dicha molécula de conjugado se selecciona de un grupo que consta de aminos catiónicos, tintes de intercalación, antibióticos, proteínas, fragmentos peptídicos y complejos metal ión.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligonucleótido tiene de 10 a 100 bases de longitud.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligonucleótido tiene de 10 a 15 bases de longitud.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido incluye, además, un marcador.

9. El uso conforme de la reivindicación 8, en el que el marcador es un agente quimioluminiscente o un agente fluorescente.

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se ha sometido la muestra a un procedimiento de amplificación.

11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se inmoviliza directa o indirectamente el oligonucleótido fijándolo a un soporte sólido.

12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la muestra se obtiene de una fuente clínica, de una fuente alimenticia, o de una fuente medioambiental.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la sonda y todo complejo sonda:diana están libres en una solución.

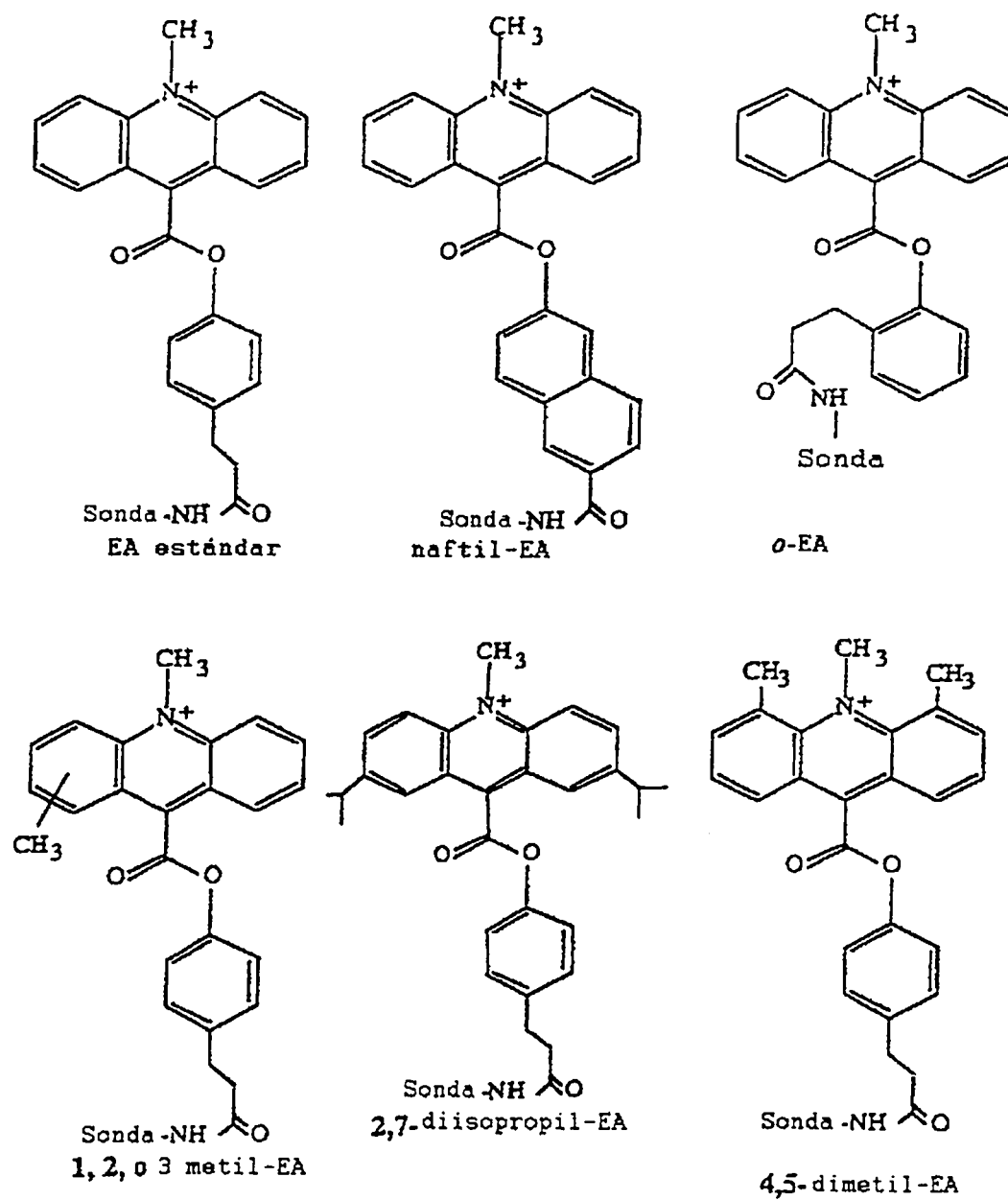


Fig. 1A

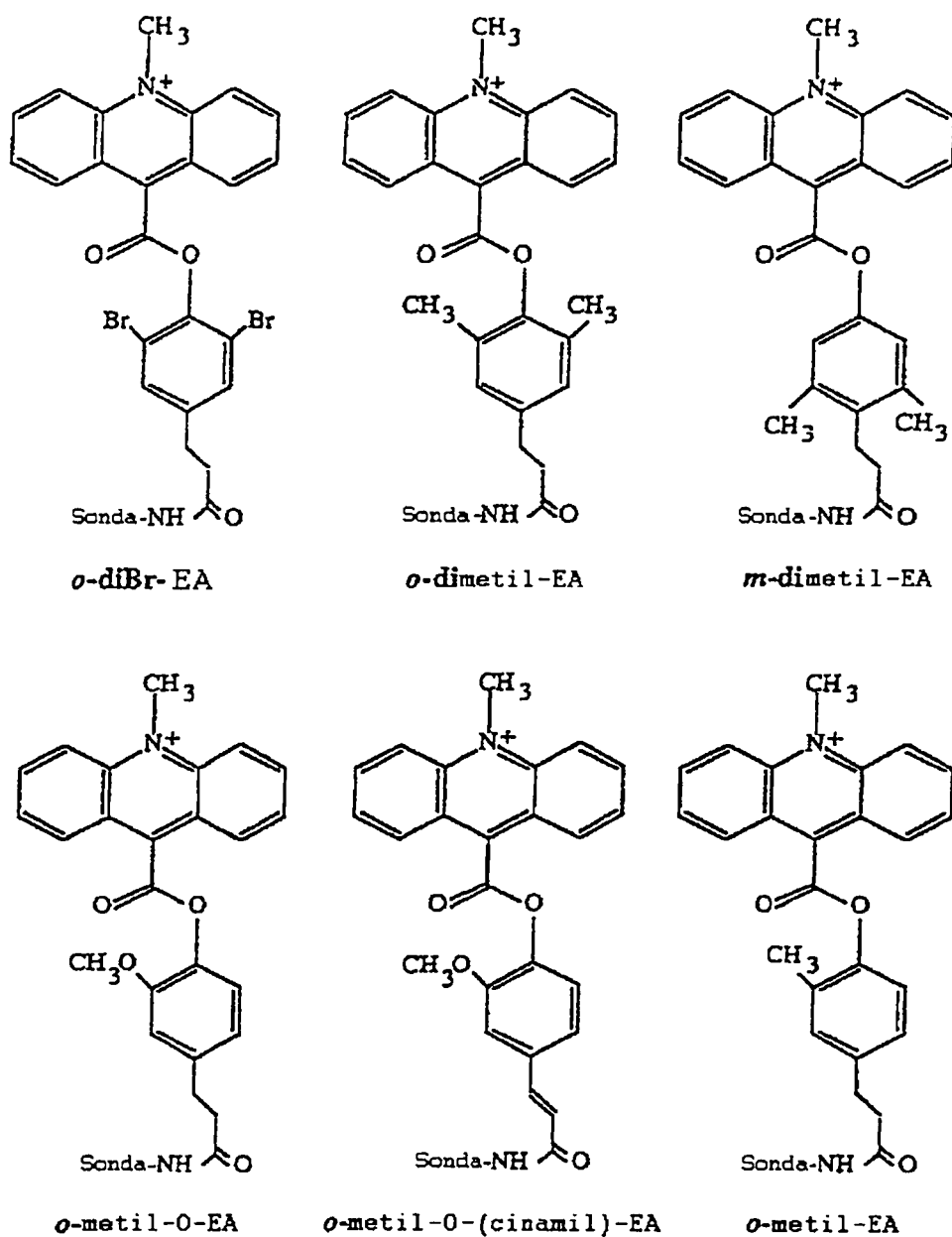


Fig. 1B

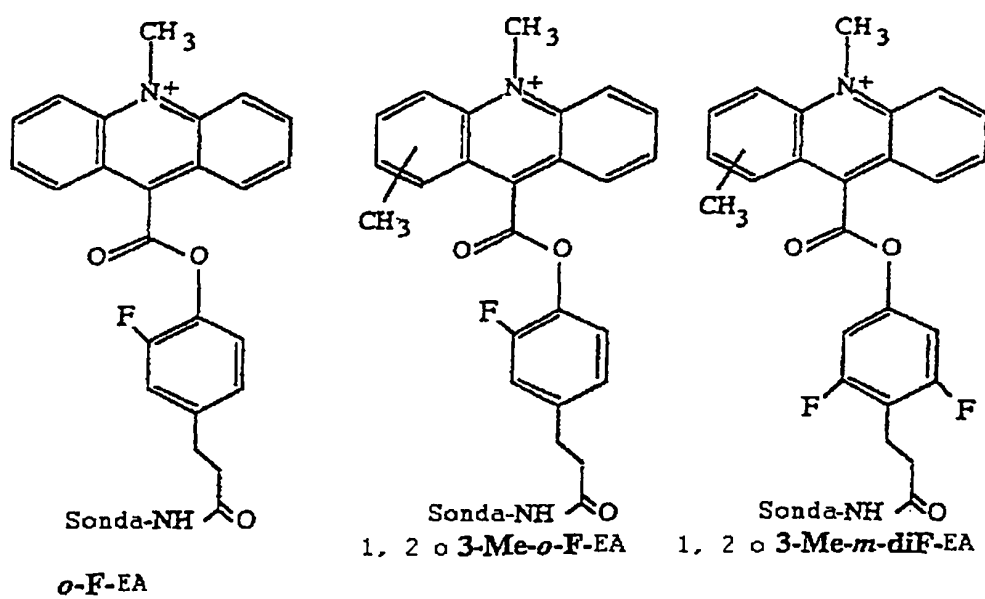


Fig. 1C

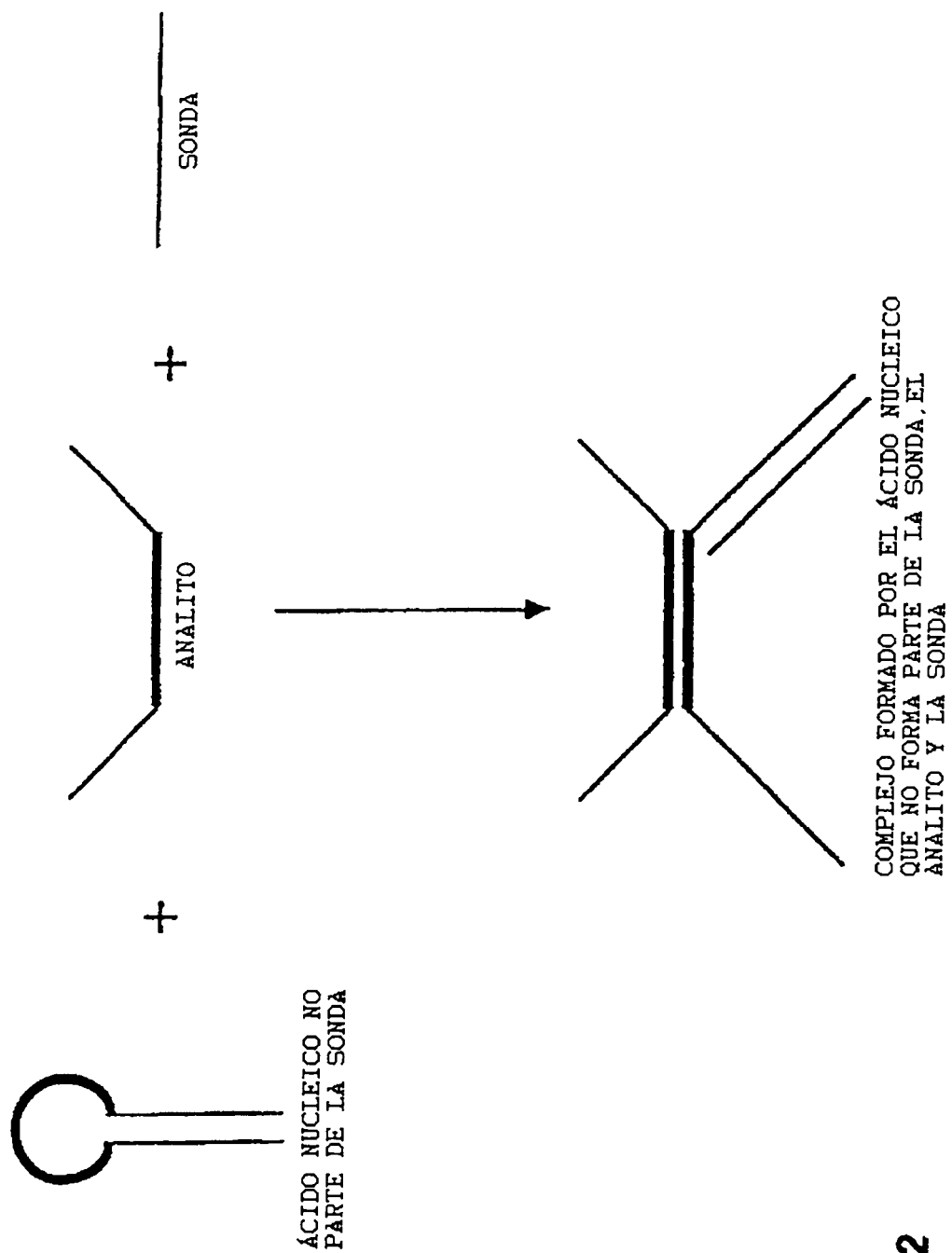


Fig. 2

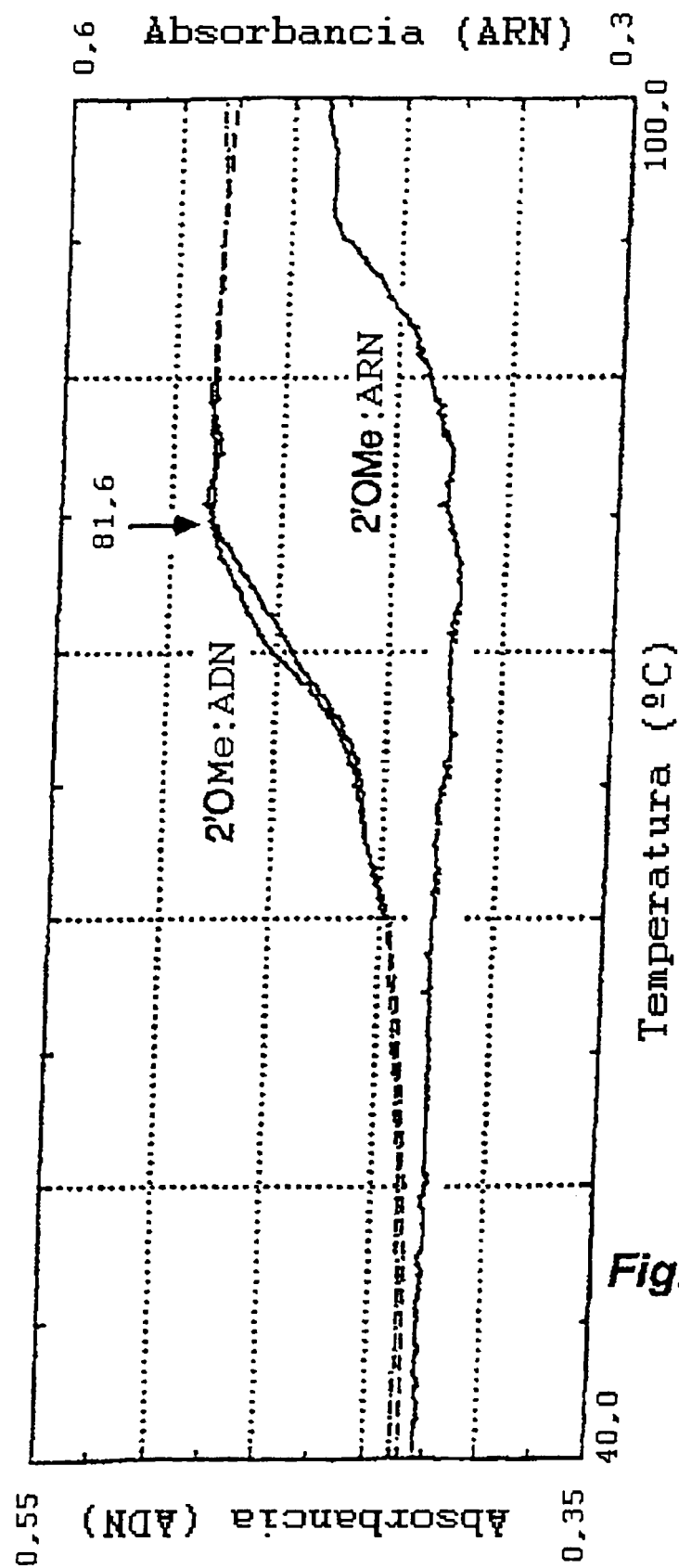


Fig. 3

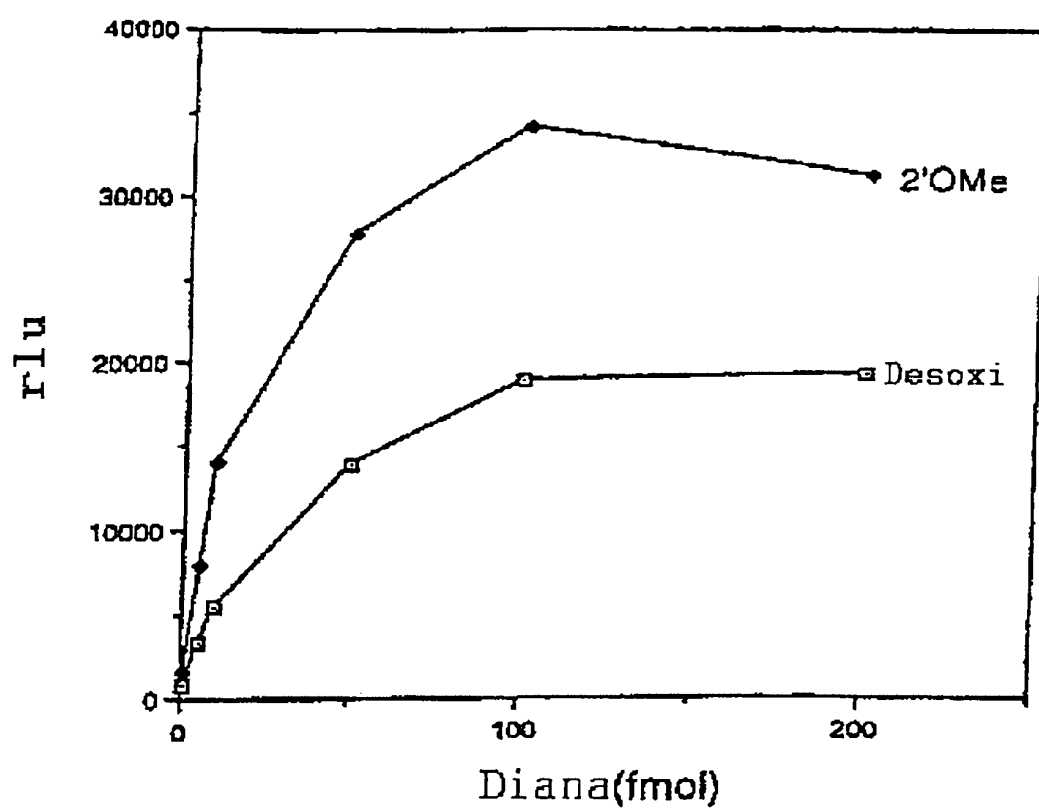


Fig. 4

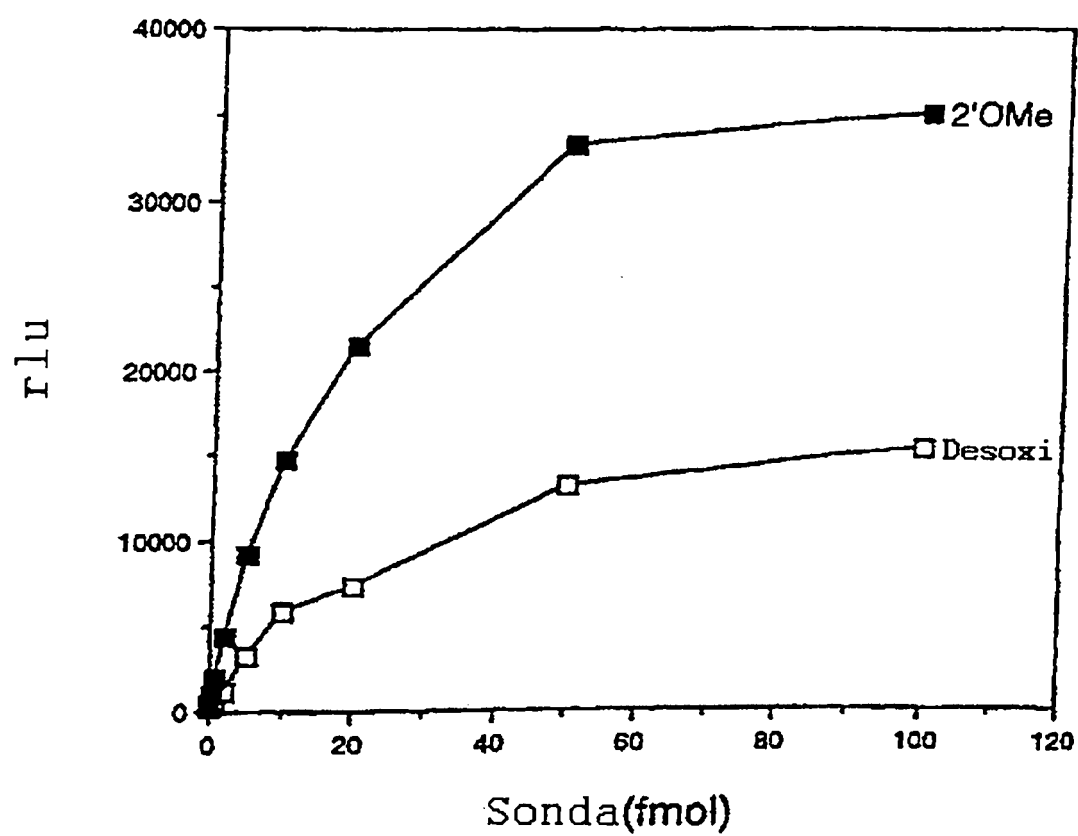


Fig. 5

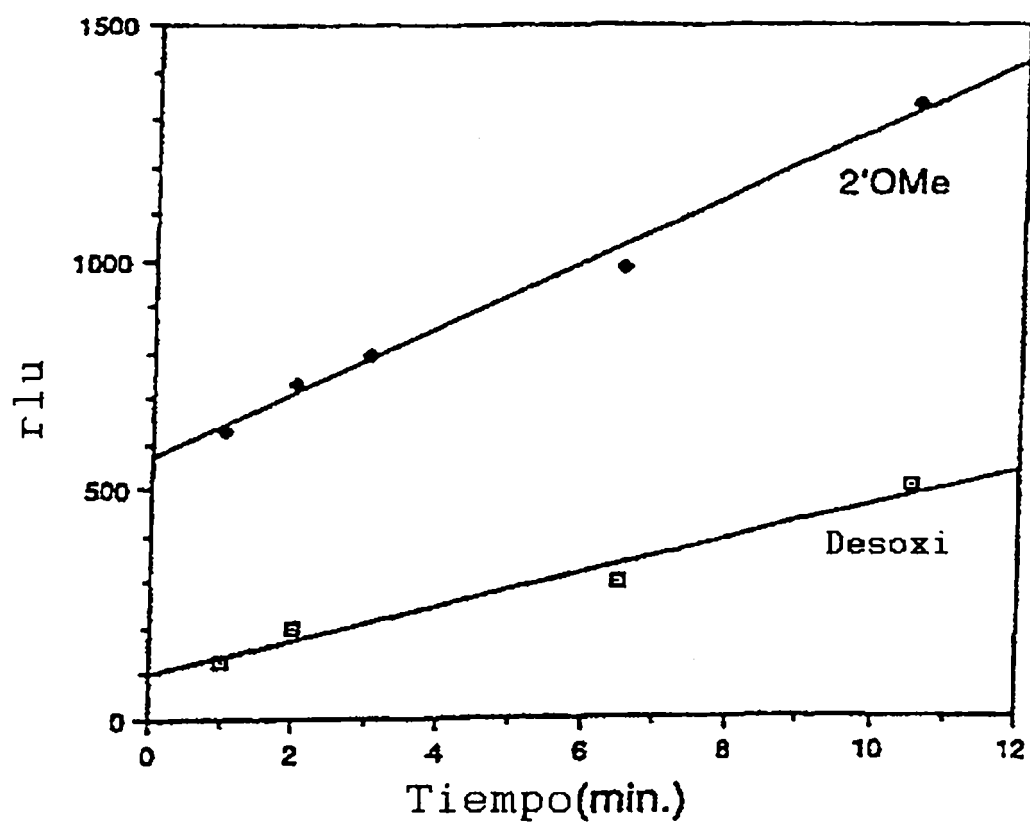


Fig. 6

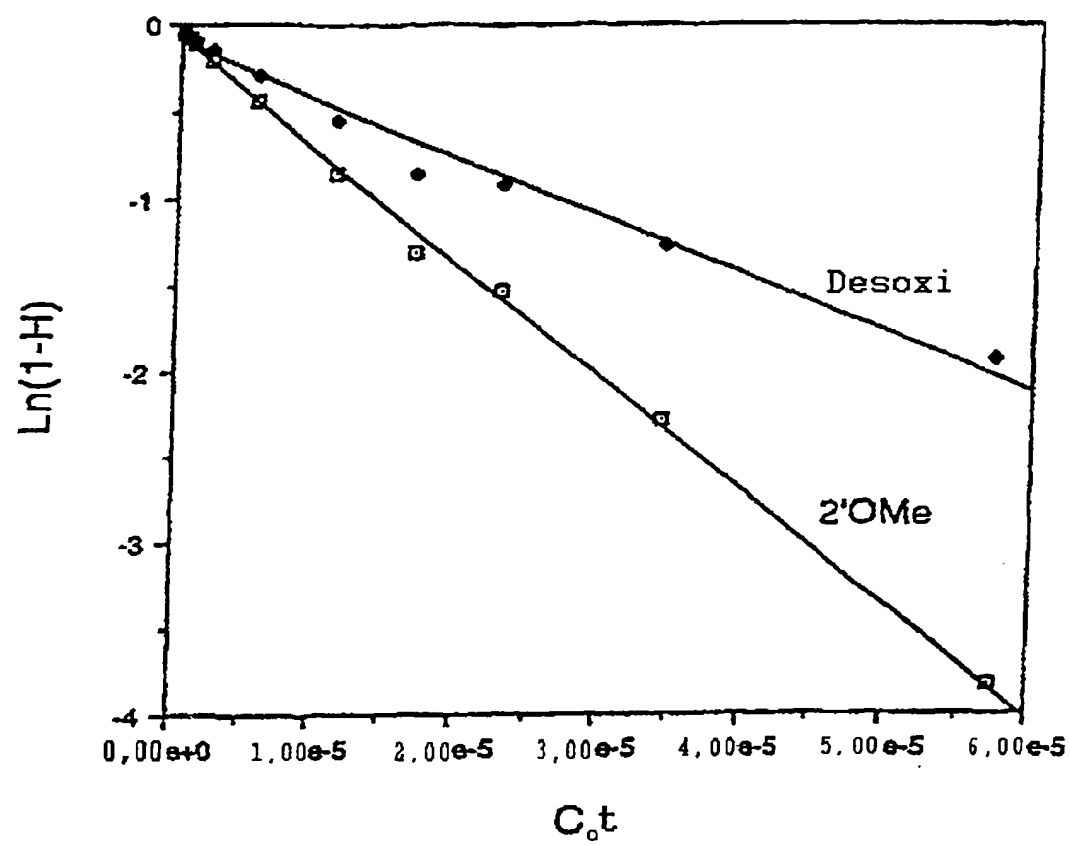


Fig. 7

ES 2 270 467 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTES: Becker, Michael M.
Majlessi, Mehrdad
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Métodos para la detección y la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos empleando oligonucleótidos modificados que presentan una mayor T_m específica de diana
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- 15 (A) DESTINATARIO: Gen-Probe Incorporated
(B) CALLE: 9800 Campus Point Drive
(C) CIUDAD: San Diego
(D) ESTADO/PROVINCIA: California
20 (E) PAÍS: Estados Unidos de América
(F) CÓDIGO POSTAL: 92121
- (v) FORMATO LEGIBLE EN UN ORDENADOR/COMPUTADORA:
- 25 (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete de 3,5 pulgadas de 1,44 Megabytes
(B) ORDENADOR: Tipo IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS, Versión 6.22
30 (D) SOFTWARE: FastSEQ, Versión 1.5
- (vi) INFORMACIÓN SOBRE EL REPRESENTANTE LEGAL/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Fisher, Carlos A.
35 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36510
(C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: GP95013
- (vii) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:
- 40 (A) TELÉFONO: (+1) 619-535-2807
(B) FAX: (+1) 619-546-7929

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 1:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
50 (C) TIPO DE CADENA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1
- 55 GCTCGTTGCG GGACTTAACC CAACAT

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 2:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
65 (C) TIPO DE CADENA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 270 467 T3

(ii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGC

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65